



**ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΩΝ ΥΒΡΙΔΙΚΩΝ ΥΛΙΚΩΝ ΜΕΣΩ
ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΗΣ ΧΗΜΙΚΗΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗΣ ΙΝΩΝ ΚΑΙ
ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΟΥΣ ΩΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ**

ΑΝΝΙΤΑ ΘΕΟΦΑΝΟΥΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2025



**ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΩΝ ΥΒΡΙΔΙΚΩΝ ΥΛΙΚΩΝ ΜΕΣΩ
ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΗΣ ΧΗΜΙΚΗΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗΣ ΙΝΩΝ ΚΑΙ
ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΟΥΣ ΩΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ**

ΑΝΝΙΤΑ ΘΕΟΦΑΝΟΥΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2025

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Χημείας της Σχολής Θετικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2».

Ορισμός Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής από τη Γ.Σ.Ε.Σ:1032/12-02-2021

Επιβλέπουσα:

Λουλούδη Μαρία, Καθηγήτρια Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη:

Γαρούφης Αχιλλέας, Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Δεληγιαννάκης Ιωάννης, Καθηγητής Τμήματος Φυσικής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ορισμός Θέματος Διδακτορικής Διατριβής: 1034/23-03-2021

Θέμα Διδακτορικής Διατριβής:

**Ανάπτυξη λειτουργικών υβριδικών υλικών μέσω επιφανειακής χημικής
τροποποίησης ινών και αξιολόγησή τους ως αντιοξειδωτικά**

Ορισμός Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής από τη Γ.Σ.Ε.Σ:1135/17-02-2025

Λουλούδη Μαρία, Καθηγήτρια Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Γαρούφης Αχιλλέας, Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Δεληγιαννάκης Ιωάννης, Καθηγητής Τμήματος Φυσικής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μαλανδρίνος Γεράσιμος, Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μάνος Εμμανουήλ, Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Πλακατούρας Ιωάννης, Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Τσίκαρης Βασίλειος, Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ευχαριστίες

Μετά την ολοκλήρωση αυτής της διδακτορικής διατριβής που εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιομηχανικής Κατάλυσης & Υβριδικών Υλικών του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων θα ήθελα να εκφράσω τη βαθιά μου ευγνωμοσύνη στα άτομα των οποίων οι ανεκτίμητες συνεισφορές και η αμέριστη υποστήριξη ήταν καθοριστικές για την ολοκλήρωση του επιστημονικού ταξιδιού που ονομάζεται διδακτορική διατριβή.

Κατ' αρχάς, εκφράζω την ειλικρινή μου ευγνωμοσύνη στην επιβλέπουσα καθηγήτριά μου, κ. Μαρία Λουλούδη, Καθηγήτρια του Τμ. Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, η οποία με εμπιστεύτηκε και με προθυμία μοιράστηκε μαζί μου τις επιστημονικές τις γνώσεις και σκέψεις ώστε να διεκπεραιωθεί η παρούσα διδακτορική διατριβή. Η ανεκτίμητη καθοδήγηση, η βοήθεια και η αμέριστη υποστήριξή της λειτούργησαν ως κρίσιμοι πόροι, επιτρέποντάς μου να γράψω τον επίλογο αυτού του μεγάλου γεμάτου γνώσεις ταξιδιού.

Θα ήθελα επίσης να πω ένα τεράστιο ευχαριστώ και στον κ. Ιωάννη Δεληγιαννάκη, Καθηγητή του Τμ. Φυσικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για τον καθοριστικό του ρόλο στην επιτυχή ολοκλήρωση της διατριβής μου. Σε πολλά κρίσιμα σημεία η βοήθειά του ήταν πολύτιμη και καθοριστική. Η πόρτα του ήταν πάντα ανοιχτή, ήταν πάντα πρόθυμος να βοηθήσει και οι συμβουλές του ήταν εποικοδομητικές και αποτελεσματικές.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Γαρούφη Αχιλλέα, Καθηγητή του Τμ. Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για την πολύτιμη βοήθειά του ως μέλος της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής. Ακόμα, θέλω να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής, δηλαδή κ. Μαλανδρίνο Γεράσιμο, Καθηγητή Τμ. Χημείας, κ. Μάνο Εμμανουήλ, Καθηγητή Τμ. Χημείας, κ. Πλακατούρα Ιωάννη, Καθηγητή Τμ. Χημείας και κ. Τσίκαρη Βασίλειο, Καθηγητή Τμ. Χημείας

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους συναδέλφους τόσο μεταπτυχιακούς όσο και υποψήφιους διδάκτορες τόσο από το εργαστήριο Βιομηχανικής Κατάλυσης & Υβριδικών Υλικών του Τμήματος Χημείας όσο και από το εργαστήριο Φυσικοχημείας Υλικών και Περιβάλλοντος του Τμήματος Φυσικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για την άψογη συνεργασία, βοήθεια και στήριξή τους. Πιο συγκεκριμένα θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δρ Κατερίνα Γεμεντεζή η οποία ήταν πάντα πρόθυμη να παρέχει ανιδιοτελώς τις πολύτιμες γνώσεις της καθώς και τη βοήθεια της σε οτιδήποτε χρειαζόταν. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στους υποψήφιους Διδάκτορες, Χρήστο Δημητρίου και την Αρετή Ζίνδρου από το εργαστήριο Φυσικοχημείας Υλικών και Περιβάλλοντος

του Τμήματος Φυσικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων οι οποίοι ήταν πάντα πρόθυμοι να παρέχουν την πολύτιμη βοήθειά τους σε ότι χρειαζόμουν.

Δεν μπορώ παρά να ευχαριστήσω άλλα δύο άτομα που έπαιξαν καθοριστικό ρόλο στην εκπόνηση της διδακτορικής μου διατριβής. Αρχικά, οφείλω να πω ένα τεράστιο ευχαριστώ μέσα από τα βάθη της καρδιάς μου στην υποψήφια Διδάκτορα Κωνσταντίνα Γραββάνη η οποία πάντα με χαμόγελο και αγάπη μου παρείχε τόσο φιλική και ψυχολογική υποστήριξη όσο και επιστημονική. Άλλο ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον Δρ. Παύλο Ψαθά, ο οποίος εκτός από σύντροφός μου στη ζωή, ήταν και συνοδοιπόρος σε όλο το ταξίδι του διδακτορικού, ζώντας καθημερινά τον ενθουσιασμό μου, το άγχος καθώς και τη λύπη πολλές φορές. Ήταν πάντα εκεί να με βοηθάει να σηκώνομαι παρέχοντας τόσο επιστημονική υποστήριξη όσο και ψυχολογική υποστήριξη.

Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στον αφανείς ήρωές μου τους γονείς μου, για την αμέριστη υποστήριξη και τη σταθερή παρουσία τους καθ' όλη τη διάρκεια αυτού του δύσκολου ταξιδιού που οδήγησε στην ολοκλήρωση της διατριβής μου. Η υπομονή, η αγάπη και η καθοδήγησή τους αποτέλεσαν το θεμέλιο που μου επέτρεψε να ξεπεράσω τα εμπόδια και να επιτύχω τους στόχους και τις φιλοδοξίες μου.

Θα ήθελα να αναφέρω ότι ένα μέρος της παρούσας διδακτορικής διατριβής χρηματοδοτήθηκε στο πλαίσιο της Πράξης «Κέντρο Έρευνας, Ποιοτικής Ανάλυσης Υλικών Πολιτισμικής Κληρονομιάς και Επικοινωνίας της Επιστήμης» (MIS 5047233) που εντάσσεται στη Δράση «Ενίσχυση των Υποδομών Έρευνας και Καινοτομίας» και χρηματοδοτείται από το Επιχειρησιακό Πρόγραμμα «Ανταγωνιστικότητα, Επιχειρηματικότητα και Καινοτομία» στο πλαίσιο του ΕΣΠΑ 2014-2020, με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Ευρωπαϊκό Ταμείο Περιφερειακής Ανάπτυξης).

Περιεχόμενα

Περίληψη	12
Abstract.....	15
1. Κεφάλαιο: Θεωρητικό Μέρος	17
1.1. Αντιοξειδωτικά	18
1.1.1. Τι ορίζεται ως αντιοξειδωτικό	18
1.1.2. Φυσικά Αντιοξειδωτικά.....	20
1.2. Δραστικά Είδη Οξυγόνου (ROS), Δραστικά Είδη Αζώτου (RNS), Ελεύθερες Ρίζες και άλλα Οξειδωτικά Είδη	25
1.3. Κατηγορίες Ελεύθερων Ριζών	27
1.4. Μηχανισμοί δράσης των αντιοξειδωτικών υλικών.	31
1.4.1. Μηχανισμός Διαδοχικής Απώλειας Πρωτονίων και Μεταφοράς Ηλεκτρονίων (SPLET) 33	
1.4.2. Μηχανισμός Απλής Μεταφοράς Ηλεκτρονίου- Πρωτονίου (SET-PT).....	34
1.4.3. Μηχανισμός Μεταφοράς Ατόμου Υδρογόνου (HAT).....	35
1.5. Μέθοδοι αξιολόγησης της αντιοξειδωτικής δράσης	37
1.5.1. Αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω φασματοσκοπίας φθορισμού.....	38
1.5.2. Αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω φασματοσκοπίας Ηλεκτρονικού Παραμαγνητικού Συντονισμού (EPR)	41
1.5.3. Αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω φασματοσκοπίας Υπεριώδους-Ορατού (UV-Vis)	42
1.6. Τύποι Έκφρασης της αντιοξειδωτικής ικανότητας	52
1.7. Τεχνητά βιομιμητικά νανοαντιοξειδωτικά.....	54
1.8. Βελτιστοποίηση αντιοξειδωτικών συστημάτων με βιομιμητική νανομηχανική.....	55
1.8.1. Υβριδικά νανοαντιοξειδωτικά μέσω μη ομοιοπολικής τροποποίησης	56
1.8.2. Νανο-ένζυμα	58
1.8.3. Βιολογική νανομηχανική	58
1.8.4. Επιφανειακή χημική τροποποίηση υλικών με εμβολιασμό φυσικών αντιοξειδωτικών ή λειτουργικών συστατικών για την παραγωγή υβριδικών αντιοξειδωτικών	59
1.8.5. Σίλικά (SiO ₂)	62
1.8.6. Μέθοδοι σύνθεσης υβριδικών υλικών που έχουν ως υλικό υποστήριξης τη σίλικά (SiO ₂) 65	
1.8.7. Αντιοξειδωτικά υλικά που έχουν ως υλικό υποστήριξης τη σίλικά (SiO ₂)	70

1.8.8.	Υβριδικά υλικά με χρήση γαλλικού οξέος (GA) ως αντιοξειδωτικής μονάδας	73
1.8.9.	Υβριδικά υλικά με χρήση του υαλουρονικού οξέος ως αντιοξειδωτικού.....	76
1.8.10.	Υβριδικά υλικά που έχουν ως υλικά υποστήριξης νανοσωματίδια αργύρου και χρυσού (Ag, Au NPs).....	79
1.8.11.	Μετάξι (Silk fiber)	80
1.9.	Σκοπός Διδακτορικής Διατριβής	88
2.	Κεφάλαιο: Πειραματικό Μέρος	89
2.1.	Χημικά- Αντιδραστήρια και Τεχνικές Χαρακτηρισμού.....	90
2.1.1.	Φασματοσκοπία Υπερύθρου FT-IR	91
2.1.2.	Φασματοσκοπία Raman	93
2.1.3.	Θερμοσταθμική Διαφορική Θερμική Ανάλυση (TG-DTA)	94
2.1.4.	Φασματοσκοπία Υπεριώδους- Ορατού (UV-Vis).....	95
2.1.5.	Φασματοσκοπία Ηλεκτρονικού Παραμαγνητικού Συντονισμού (EPR)	97
2.1.6.	N ₂ προσρόφηση-εκρόφηση Brunauer-Emmett-Teller (BET)	103
2.1.7.	Δυναμική Σκέδαση Φωτός (DLS) και Δυναμικό ζήτα (ZP).	104
3.	Κεφάλαιο: Αποτελέσματα	
	Πρώτο Μέρος : Υβριδικά υλικά SFd@GLA, SFd@GLAM, GLAM@SFd@GLAM και SFd@GA.....	107
3.1.	Σύνθεση και χαρακτηρισμός των υβριδικών υλικών με βάση το μετάξι: SFd@GLA, SFd@GLAM, το διπλά ακινητοποιημένο GLA@SFd@GLA και SFd@GA	108
3.1.1.	Εισαγωγή.....	108
3.1.2.	Διαδικασία αποκομμίωσης: μια επεξεργασία για την απομάκρυνση της σερίκνης από το μεταξωτό ύφασμα.....	109
3.1.3.	Σύνθεση του υβριδικού υλικού SFd@GLA: Επιφανειακή τροποποίηση της επιφάνειας του αποκομιωμένου μεταξιού (SFd) με το μονομερές του γλουκουρονικού οξέος.	110
3.1.4.	Χαρακτηρισμός του υβριδικού υλικού SFd@GLA	112
3.1.5.	Σύνθεση του υβριδικού υλικού SFd@GLAM: Επιφανειακή τροποποίηση της επιφάνειας του αποκομιωμένου μεταξιού (SFd) με το μονομερές της Ν-Ακετυλ-D-Γλυκοζαμίνης.	122
3.1.6.	Χαρακτηρισμός του υβριδικού υλικού SFd@GLAM	123
3.1.7.	Σύνθεση του διπλά εμβολιασμένου υβριδικού υλικού GLA@SFd@GLAM σε μοριακή αναλογία (GLA:GLAM) [2:1]: Επιφανειακή τροποποίηση του αποκομιωμένου μεταξιού (SFd) από τα μονομερή D-Γλυκουρονικό οξύ και Ν-Ακετυλ-D-Γλυκοζαμίνη.....	129
3.1.8.	Χαρακτηρισμός του υβριδικού υλικού GLA@SFd@GLAM	131
3.1.9.	Σύνθεση του υβριδικού υλικού SFd@GA: Επιφανειακή τροποποίηση του αποκομιωμένου μεταξιού (SFd) με το μονομερές του γαλλικού οξέος (GA)	138

3.1.10.	Χαρακτηρισμός του υβριδικού υλικού SFd@GA	140
3.2.	Αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης των υβριδικών υλικών του μεταξιού, έναντι των ριζών DPPH	152
3.2.1.	Αξιολόγηση της ικανότητας εξουδετέρωσης των ριζών DPPH από τα υβριδικά υλικά, παράγωγα του υαλουρονικού οξέος: SFd@GLA, SFd@GLAM και GLA@SFd@GLAM	152
3.2.2.	Δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης ως αντιοξειδωτικά των υβριδικών υλικών SFd@GLA, SFd@GLAM και του διπλά εμβολιασμένου GLA@SFd@GLAM	155
3.2.3.	Αξιολόγηση της ικανότητας εξουδετέρωσης ριζών DPPH από το υβριδικό υλικό SFd@GA	161
3.2.4.	Δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης του υβριδικού υλικού SFd@GA.....	164
3.2.5.	Διερεύνηση του μηχανισμού επανενεργοποίησης της αντιοξειδωτικής αποτελεσματικότητας στο SFd@GA	169
3.2.6.	Η αντιοξειδωτική δραστηριότητα του SFd@GA σε διάφορα μέσα.....	173
3.2.7.	Συμπεράσματα	177
3.3.	Μέλετη της αντιοξειδωτικής ικανότητας των υβριδικών υλικών SiO ₂ @GA, SiO ₂ @GLA, SiO ₂ @GLAM και GLA@SiO ₂ @GLAM, έναντι των ριζών OH, καθώς και συγκριτική μελέτη σε σχέση με την αντιοξειδωτική τους δράση έναντι των ριζών DPPH.	180
3.3.1.	Εισαγωγή.....	180
3.3.2.	Σύνθεση των υβριδικών υλικών SiO ₂ @GA, SiO ₂ GLA, SiO ₂ @GLAM και του διπλά εμβολιασμένου GLA@SiO ₂ @GLAM.	182
3.3.3.	Αξιολόγηση της ικανότητας εξουδετέρωσης ριζών υδροξυλίου (•OH)	183
3.3.4.	Πειραματικά Αποτελέσματα αξιολόγησης της ικανότητας εξουδετέρωσης των ριζών υδροξυλίου (•OH)	185
3.3.5.	Συγκριτική μελέτη της ικανότητας των αντιοξειδωτικών να εξουδετερώνουν τόσο τις ρίζες OH και όσο και τις ρίζες DPPH.	195
3.3.6.	Συμπεράσματα	204
3.4.	Μελέτη της αλληλεπίδρασης των υβριδικών υλικών SFd@GA, SFd@GLA, SFd@GLAM και GLA@SFd@GLAM, με τις ρίζες OH, καθώς και συγκριτική μελέτη σε σχέση με την αντιοξειδωτική τους δράση έναντι των ριζών DPPH.....	205
3.4.1.	Εισαγωγή.....	205
3.4.2.	Αλληλεπίδραση των τροποποιημένων μεταξωτών ινών με ρίζες υδροξυλίου (•OH)	205
3.4.3.	Δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης όλων των υβριδικών υλικών μετά την έκθεσή τους σε ρίζες OH παραγόμενες από την αντίδραση Fenton.....	219
3.4.4.	Διαδοχική χρήση των μεταξωτών υφασμάτων κατά των ριζών DPPH μετά την αλληλεπίδρασή τους με •OH.....	222

3.4.5.	Συζήτηση σχετικά με την ικανότητα εξουδετέρωσης ριζών DPPH μέσω HAT & την προστατευτική δράση έναντι ριζών OH.....	223
3.4.6.	Συμπεράσματα	226
3.5.	Σύνθεση και χαρακτηρισμός υβριδικών υλικών που έχουν ως υλικό υποστήριξης σίλικα και ως αντιοξειδωτικό τη σερικίνη του μεταξιού: SiO ₂ @sericin (10%) και SiO ₂ @sericin (20%)...	228
3.5.1.	Εισαγωγή.....	228
3.5.2.	Σύνθεση του υβριδικού υλικού SiO ₂ @sericin (10% φόρτωση).	228
3.5.3.	Σύνθεση του υβριδικού υλικού SiO ₂ @sericin (20% φόρτωση).	229
3.5.4.	Χαρακτηρισμός των υβριδικών υλικών της σερικίνης με μήτρα τη σίλικα.	230
3.5.5.	Αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης των υβριδικών υλικών έναντι των ριζών DPPH.	243
3.5.6.	Αξιολόγηση της ικανότητας αλληλεπίδρασης των υλικών σερικίνης με ρίζες υδροξυλίου (•OH)	246
3.5.7.	Συγκριτική ανάλυση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των υλικών σερικίνης έναντι ριζών υδροξυλίου και DPPH.	251
3.5.3.	Συμπεράσματα	253
Κεφάλαιο 4:	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	255
4.	Συμπεράσματα.....	256
	Βιβλιογραφία	260

Περίληψη

Το μετάξι θεωρείται ως η «βασίλισσα των υφασμάτων» και χρησιμοποιείται στα υφάσματα καθώς και στην ιατρική από αρχαιοτάτων χρόνων, λόγω των εκπληκτικών ιδιοτήτων που παρέχει. Τα τελευταία χρόνια έχει χρησιμοποιηθεί πολύ και στην επιστημονική κοινότητα για τη δημιουργία λειτουργικών υβριδικών υλικών που έχουν ως μήτρα το μετάξι και εμφανίζουν ακόμα καλύτερες ιδιότητες από το φυσικό μετάξι.

Βάσει αυτού ο σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η σύνθεση νέων λειτουργικών υβριδικών υλικών που θα είχαν ως υλικό υποστήριξης το μετάξι και θα εμφάνιζαν αντιοξειδωτικό χαρακτήρα. Για την δημιουργία υβριδικών αντιοξειδωτικών υλικών με βάση το μετάξι χρησιμοποιήθηκαν ως αντιοξειδωτικά υλικά τα μονομερή του υαλουρονικού οξέος, D-Γλυκουρονικό οξύ και N-Ακετυλ- D-Γλυκοζαμίνη καθώς και ο βασιλιάς των αντιοξειδωτικών το γαλλικό οξύ. Η σύνθεση όλων των υβριδικών υλικών πραγματοποιήθηκε με μια διεργασία τύπου sol-gel, μέσω ομοιοπολικής τροποποίησης. Με αυτό τον τρόπο συντέθηκαν τα υβριδικά υλικά SFd@GLA, SFd@GLAM, GLA@SFd@GLAM και SFd@GA. Όλα τα υβριδικά υλικά χαρακτηρίστηκαν μέσω προηγμένων τεχνικών ανάλυσης, όπως SEM, FT-IR, Raman, TG-DTA, EPR.

Αρχικά τα υβριδικά υλικά SFd@GLA, SFd@GLAM, GLA@SFd@GLAM και SFd@GA αξιολογήθηκαν ως προς την ικανότητα τους να εξουδετερώνουν τις ρίζες DPPH. Δημιουργήθηκε ένα νέο πρωτόκολλο για την επίτευξη αυτού του στόχου. Από τα αποτελέσματα της μελέτης της αντιοξειδωτικής δράσης αποδείχθηκε ότι το υβριδικό υλικό SFd@GA εμφανίζει την μεγαλύτερη ικανότητα εξουδετέρωσης των ριζών DPPH, ενώ ακολουθεί το διπλά εμβολιασμένο υβριδικό υλικό GLA@SFd@GLAM. Αποδείχθηκε επίσης ότι και τα τέσσερα υβριδικά υλικά μπορούν να επαναχρησιμοποιηθούν αρκετές φορές χωρίς να αλλοιωθεί η αντιοξειδωτική τους ικανότητα, με πρωτοπόρο πάλι το υβριδικό υλικό SFd@GA που μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί έως και 15 φορές.

Επειδή από τη βιβλιογραφία απουσίαζε μια πλήρης συγκριτική μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας υβριδικών υλικών έναντι των ριζών DPPH και OH, αποφασίσαμε να εισάγουμε μια τέτοια μελέτη. Για την επίτευξη αυτού του στόχου αρχικά χρησιμοποιήθηκαν τα υβριδικά υλικά που είχαν ως μήτρα τη σίλικα, SiO₂@GLA, SiO₂@GLAM, GLA@SiO₂@GLAM και SiO₂@GA,

τα οποία συντέθηκαν, χαρακτηρίστηκαν και αξιολογήθηκαν ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση έναντι των ριζών DPPH κατά τη διάρκεια της μεταπτυχιακής μου διατριβής. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή αξιολογήθηκε η αντιοξειδωτική τους δράση έναντι ριζών OH με τη χρήση φασματοσκοπίας EPR. Τα αποτελέσματα της μελέτης της αντιοξειδωτικής ικανότητας των υβριδικών υλικών έναντι των ριζών OH έδειξαν ότι και πάλι το καλύτερο από όλα τα υλικά είναι το υβριδικό υλικό SiO₂@GA. Από τη συγκριτική μελέτη των υβριδικών υλικών καθώς και των ελεύθερων αντιοξειδωτικών μορίων έναντι των ριζών DPPH και OH φάνηκε ότι υιοθετούνται διαφορετικοί μηχανισμοί ανάλογα με το αντιοξειδωτικό και τη ρίζα στόχο. Σε ότι αφορά το γαλλικό οξύ που είναι μια φαινολική ένωση, δρα έναντι των ριζών DPPH μέσω του μηχανισμού HAT με την απόσπαση του ατόμου υδρογόνου να πραγματοποιείται από OH ομάδα, ενώ δρα έναντι των ριζών OH μέσω του μηχανισμού SET. Αντίθετα, το Γλυκουρονικό οξύ και η γλυκοζαμίνη που είναι σάκχαρα, δρουν έναντι των ριζών DPPH μέσω του μηχανισμού HAT με την απόσπαση του ατόμου υδρογόνου να πραγματοποιείται από OH ομάδα, ενώ έναντι των ριζών OH μέσω του μηχανισμού HAT με την απόσπαση του ατόμου υδρογόνου να πραγματοποιείται από CH ομάδα.

Δεδομένης της αξιοσημείωτης αντιοξειδωτικής δράσης των υβριδικών υλικών με υλικό υποστήριξης τη σίλικα έναντι των •OH, η παρούσα μελέτη συνέχισε τη διερεύνηση της δράσης υβριδικών υλικών που ενσωματώνουν το αποκομμιωμένο μετάξι (SFd) ως μήτρα έναντι ριζών υδροξυλίου και τη διαλεύκανση των υποκείμενων μηχανισμών. Επιπλέον, αξιολογήθηκε η δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης αυτών των υβριδικών υλικών μετά την αλληλεπίδρασή τους με ρίζες υδροξυλίου. Είναι ενδιαφέρον ότι τα αποτελέσματα της μελέτης σχετικά με την αλληλεπίδραση των υβριδικών υλικών - SFd@GLA, SFd@GLAM, GLA@SFd@GLAM και SFd@GA - με ρίζες υδροξυλίου (•OH) αποκάλυψαν ότι τόσο τα υβριδικά υλικά όσο και το φυσικό μετάξι που περιέχει σερίκίνη διαθέτουν προστατευτική δομή πλέγματος, η οποία εμποδίζει αποτελεσματικά τις ρίζες υδροξυλίου να αλληλεπιδράσουν με τα υλικά. Και εδώ το καλύτερο από όλα τα υλικά είναι το υβριδικό υλικό SFd@GA, το οποίο μπορεί να διατηρήσει την αυτοπροστασία του για μέχρι και 4 επαναχρησιμοποιήσεις.

Τέλος, συντέθηκαν και χαρακτηρίστηκαν με επιτυχία δύο νέα υβριδικά υλικά, ενσωματώνοντας τη σερίκίνη ως αντιοξειδωτικό και τη σίλικα ως υλικό υποστήριξης: SiO₂@sericin με 10% φόρτωση σερίκινης και SiO₂@sericin με 20% φόρτωση σερίκινης. Μεταξύ

των συντιθέμενων υλικών, το SiO₂@sericin (10% φόρτωση σε σερικίνη) παρουσίασε την υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση, επιδεικνύοντας τριπλάσια δραστικότητα HAT έναντι των ριζών DPPH σε σύγκριση με υδατικό διάλυμα σερικίνης 10% κ.β. Το ίδιο υλικό, SiO₂@sericin (10% φόρτωση σε σερικίνη), παρουσίασε επίσης την υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση και έναντι των ριζών OH.

Abstract

Silk is considered the "queen of fabrics" and has been used in textiles and medicine since ancient times, because of its amazing properties. In recent years it has also been used extensively in the scientific community to create functional hybrid materials with silk as a matrix, which have even better properties than natural silk.

Based on this, this PhD thesis aimed to synthesize new functional hybrid materials that would have silk as a support material and exhibit antioxidant character. To create hybrid silk-based antioxidant materials, the monomers of hyaluronic acid, D-Glucuronic acid, N-Acetyl-D-Glucosamine as well as the king of antioxidants gallic acid were used as antioxidant materials. The synthesis of all hybrid materials was carried out by sol-gel method through covalent modification. In this way, the hybrid materials SFd@GLA, SFd@GLAM, GLA@SFd@GLAM, and SFd@GA were synthesized. All the hybrid materials were characterized using various instruments such as SEM, FT-IR, Raman, TG-DTA, and EPR.

Initially, the hybrid materials SFd@GLA, SFd@GLAM, GLA@SFd@GLAM, and SFd@GA were evaluated for their ability to scavenge DPPH radicals. A new protocol was developed to achieve this goal. From the results of the antioxidant activity study, it was shown that the hybrid material SFd@GA exhibits the highest ability to scavenge DPPH radicals, followed by the double immobilized hybrid material GLA@SFd@GLAM. It was also shown that all four hybrid materials can be reused several times without altering their antioxidant capacity, with the SFd@GA hybrid material again leading the way as it can be reused up to 15 times.

Since the literature lacks a complete comparative study of the antioxidant activity of the hybrid materials against DPPH and OH radicals, we decided to introduce such a study. To achieve this goal, we first used the silica-based hybrid materials, SiO₂@GLA, SiO₂@GLAM, GLA@SiO₂@GLAM, and SiO₂@GA, which were synthesized, characterized, and evaluated for their antioxidant activity against DPPH radicals during my master thesis. In this PhD thesis, their antioxidant activity against OH radicals was evaluated using EPR spectroscopy, and their comparative study was analyzed. The results of the study of the antioxidant capacity of the hybrid materials against OH radicals showed that again the best of all materials is the SiO₂@GA hybrid material. From the comparative study of the hybrid materials as well as the free antioxidants

against both DPPH and OH radicals, it was shown that different mechanisms are used depending on the class of antioxidants and the target radical. As regards gallic acid, which is a phenolic compound acts against DPPH radicals through the HAT mechanism with the hydrogen atom being detached by an OH group, whereas it acts against OH radicals through the SET mechanism. On the other hand, glucuronic acid and glucosamine, which are sugars, act against DPPH radicals through the HAT mechanism with the hydrogen atom being detached from an OH group, whereas against OH radicals through the HAT mechanism with the hydrogen atom being detached from a CH group.

Given the remarkable antioxidant activity of silica-based hybrid materials against hydroxyl radicals ($\bullet\text{OH}$), the present study aimed to investigate the interaction between hybrid materials incorporating (SFd) as a support matrix and hydroxyl radicals. The research further aimed to elucidate the underlying mechanisms governing this interaction. In addition, the study evaluated the reusability of these hybrid materials after their interaction with hydroxyl radicals. Interestingly, the results of the study on the interaction of hybrid materials - SFd@GLA, SFd@GLAM, GLA@SFd@GLAM, and SFd@GA - with hydroxyl radicals ($\bullet\text{OH}$) revealed that both hybrid materials and natural silk containing sericin possess a protective lattice structure. This structure effectively prevents hydroxyl radicals from interacting with the materials. Among the tested materials, SFd@GA demonstrated superior self-protective capabilities, maintaining its resistance to hydroxyl radical degradation for up to 4 re-uses.

Finally, two hybrid materials were successfully synthesized and characterized, incorporating sericin as an antioxidant component and silica as a support material: SiO_2 @sericin with 10% sericin loading and SiO_2 @sericin with 20% sericin loading. Among the synthesized materials, SiO_2 @sericin (10% sericin loading) showed the highest antioxidant activity, demonstrating a remarkable three-fold enhancement of hydrogen atom transfer activity (HAT) against DPPH radicals compared to a 10% sericin aqueous solution (w.w). The same hybrid material SiO_2 @sericin (10% sericin loading) showed the highest antioxidant activity also against OH radicals.

1. Κεφάλαιο: Θεωρητικό Μέρος

1.1. Αντιοξειδωτικά

1.1.1. Τι ορίζεται ως αντιοξειδωτικό

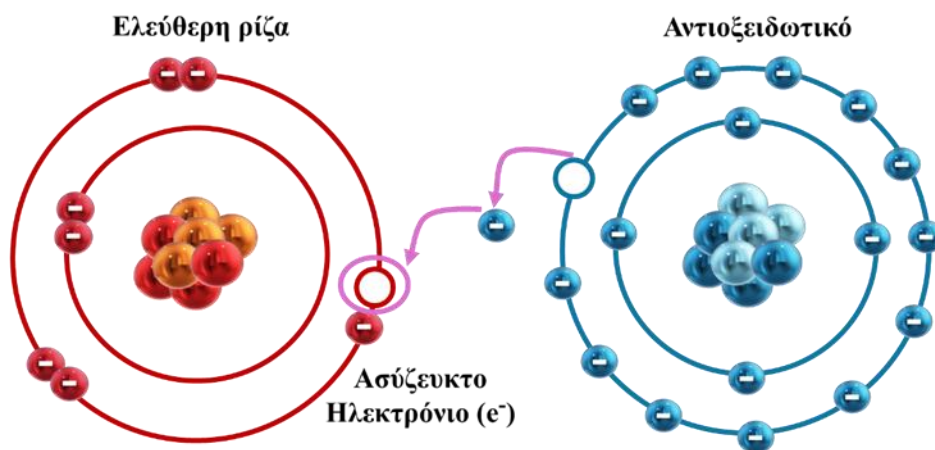
Τα αντιοξειδωτικά είναι ευρέως αναγνωρισμένες και ιδιαίτερα αξιόλογες ενώσεις, με χαρακτηριστικό παράδειγμα στη φύση τις φαινολικές ενώσεις ¹. Τα αντιοξειδωτικά έχουν στρέψει το επιστημονικό ενδιαφέρον πάνω τους λόγω του προστατευτικού τους ρόλου στην πρόληψη της οξειδωτικής αποδόμησης τόσο των φαρμακευτικών προϊόντων όσο και των τροφίμων ². Όταν μια ένωση εντοπίζεται σε μικρές συγκεντρώσεις και επιδεικνύει την ικανότητα να αναστέλλει ή να επιβραδύνει τη διαδικασία οξείδωσης των ελεύθερων ριζών, ορίζεται ως αντιοξειδωτικό ³. Σε μειωμένες συγκεντρώσεις, τα αντιοξειδωτικά αντιμετωπίζουν προκλήσεις στην αποτελεσματική αντιμετώπιση των εξαιρετικά δραστικών ριζών υδροξυλίου ($\bullet\text{OH}$), λόγω της έντονης δραστικότητάς τους με τα οργανικά μόρια ⁴. Τα αντιοξειδωτικά βρίσκονται στα φυτά, το έδαφος και τα μέταλλα, καθιστώντας τη φύση πλούσια πηγή φυσικών αντιοξειδωτικών, όπως οι τοκοφερόλες και οι πολυφαινόλες. Στη φύση, τα αντιοξειδωτικά αλληλεπιδρούν συνεργιστικά με το βιοφυσικό τους περιβάλλον, ρυθμίζοντας ενδεχομένως τη δραστικότητά τους και προστατεύοντάς τα από την αποικοδόμηση ⁵.

Τα αντιοξειδωτικά ανάλογα με τον μηχανισμό και τον τρόπο με τον οποίο δρουν ταξινομούνται σε δύο κατηγορίες: (i) πρωτογενή αντιοξειδωτικά και (ii) δευτερογενή αντιοξειδωτικά ⁶.

- (i) Ως πρωτογενή αντιοξειδωτικά ορίζονται μερικές φαινολικές ενώσεις και οι τοκοφερόλες. Τα πρωτογενή αντιοξειδωτικά δρουν είτε ως αποδέκτες ελεύθερων ριζών, είτε ως δότες υδρογόνου, ώστε να παρεμποδιστούν οι οξειδωτικές διεργασίες ⁷.
- (ii) Μέσω της δράσης των δευτερογενών αντιοξειδωτικών καθυστερείτε ο ρυθμός έναρξης της αλυσίδας, λόγω της διάσπασης των υδροϋπεροξειδίων ⁶. Στην κατηγορία των δευτερογενών αντιοξειδωτικών ανήκει το ασκορβικό οξύ ⁷.

Εναλλακτικά τα αντιοξειδωτικά κατηγοριοποιούνται ως φυσικά και συνθετικά. Τα φυσικά και συνθετικά αντιοξειδωτικά λειτουργούν ως ρυθμιστικοί παράγοντες, διαμορφώνοντας ή αναστέλλοντας το σχηματισμό και τις επιβλαβείς επιδράσεις των ελεύθερων ριζών, συνήθως μέσω

της δωρεάς ηλεκτρονίων ⁸⁻¹⁰ (**Εικόνα 1-1**). Η δράση αυτή συμβάλλει στην πρόληψη οξειδωτικών μηχανισμών που στοχεύουν σε οξειδώσιμα υποστρώματα, ακόμη και σε ελάχιστες συγκεντρώσεις ^{8,11}. Οι κυρίαρχες πηγές φυσικών αντιοξειδωτικών είναι βοτανικής φύσης και περιλαμβάνουν βρώσιμα λαχανικά, φρούτα, μπαχαρικά και βότανα. Αυτές οι βοτανικές πηγές είναι άφθονες σε βιταμίνες, φαινολικές ενώσεις, καροτενοειδή και ιχνοστοιχεία, ενισχύοντας συλλογικά τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες ¹². Ανάλογα με τη συγκεκριμένη εφαρμογή – είτε πρόκειται για τρόφιμα, καλλυντικά, βιοϊατρικές βιομηχανίες ή άλλους τομείς, ο ορισμός ενός αντιοξειδωτικού μορίου μπορεί να διαφέρει και να περιλαμβάνει παραμέτρους που αφορούν συγκεκριμένα κάθε επιστημονικό κλάδο ⁹. Πολυάριθμες μελέτες τις τελευταίες δύο δεκαετίες έχουν επιβεβαιώσει ότι ο τομέας των αντιοξειδωτικών αναδύεται με ταχείς ρυθμούς. Σε αυτό το πλαίσιο, η κατανόηση των θεμελιωδών αρχών που διέπουν τη δομή και τη λειτουργία των φυσικών αντιοξειδωτικών και η αξιοποίηση αυτής της κατανόησης στη τεχνολογία δίνουν τη δυνατότητα να προωθήσουν την ανάπτυξη νέων βιομημητικών αντιοξειδωτικών.



Εικόνα 1-1. Απεικόνιση της αντίδρασης των αντιοξειδωτικών με τις ελεύθερες ρίζες. Τα αντιοξειδωτικά παρέχουν ένα ηλεκτρόνιο στις ελεύθερες ρίζες ώστε να τις αδρανοποιήσουν. Με την πρόσληψη του ηλεκτρονίου οι ελεύθερες ρίζες αδρανοποιούνται γιατί παύουν να έχουν ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στην εξωτερική τους στοιβάδα (Εικόνα τροποποιημένη από το διαδίκτυο).

1.1.2. Φυσικά Αντιοξειδωτικά

Τα αντιοξειδωτικά συστήματα στη φύση μπορούν σε γενικές γραμμές να ταξινομηθούν σε δύο κατηγορίες: ενζυμικά και μη ενζυμικά ¹³. Τα ενζυμικά αντιοξειδωτικά έχουν μελετηθεί εκτενώς και περιλαμβάνουν κυρίως την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx), την καταλάση (CAT) και την υπεροξειδική δισμουτάση (SOD). Τα ένζυμα αυτά διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην προστασία των κυττάρων από τις οξειδωτικές βλάβες που προκαλούνται από τις ελεύθερες ρίζες ¹⁴. Τα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά συστήματα περιλαμβάνουν μια σειρά ενώσεων, όπως πολυφαινόλες, καροτενοειδή, βιταμίνες, μέταλλα και άλλα. Επιπλέον, τα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά περιλαμβάνουν πρωτεΐνες όπως η αλβουμίνη και η κερουλοπλασμίνη, καθώς και μη πρωτεϊνικά μόρια όπως το ουρικό οξύ και η χολερυθρίνη ¹³.

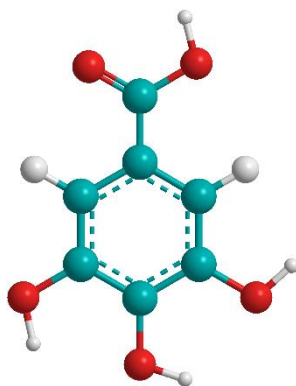
Οι πολυφαινόλες αντιπροσωπεύουν τη μεγαλύτερη κατηγορία αντιοξειδωτικών, που υπάρχουν σε αφθονία σε πολυάριθμα φυτικά είδη. Εκτενής επιστημονική βιβλιογραφία περιβάλλει αυτά τα αντιοξειδωτικά, λόγω της συσχέτισής τους με διάφορα οφέλη που παρέχουν στην υγεία, γεγονός που έχει συγκεντρώσει την επιστημονική προσοχή σε ότι αφορά τα προϊόντα τους ¹⁵. Στην κατηγορία των φαινολικών ενώσεων, μεταξύ άλλων συμπεριλαμβάνονται οι χρωστικές και οι αρωματικές ουσίες, οι οποίες εκτείνονται από απλές δομές έως συζευγμένα συμπλέγματα ¹⁶. Οι φαινολικές ενώσεις χαρακτηρίζονται από την παρουσία ενός ή περισσότερων αρωματικών δακτυλίων με μία ή περισσότερες ομάδες υδροξυλίου ¹⁷. Η αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών προέρχεται κυρίως από τις ομάδες υδροξυλίου που συνδέονται με τους βενζολικούς τους δακτυλίους ¹⁸. Όταν οι φαινολικές ενώσεις διαθέτουν περισσότερες από δύο ομάδες υδροξυλίου, ονομάζονται πολυυδροξυφαινολικές ενώσεις. Οι ενώσεις που περιέχουν περισσότερες από μία φαινολικές ομάδες αναφέρονται ως πολυφαινολικές ενώσεις ⁹.

1.1.2.1. Φαινολικές ενώσεις

Ένα εξέχον φυσικό αντιοξειδωτικό που ανήκει στην κατηγορία των φαινολικών αντιοξειδωτικών είναι το καφεϊκό οξύ (CA) (3,4-διυδροξυκινναμωμικό οξύ), γνωστό για τις καρδιοπροστατευτικές, ανοσοτροποποιητικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητές του. Το καφεϊκό οξύ (CA) είναι ένα φυσικό φαινολικό οξύ που υπάρχει στα φυτά και σε ορισμένα βότανα, καθώς και στο κρασί. Θεωρείται επίσης ως μία από τις βασικές φυσικές φαινόλες του αργανέλαιου ¹⁹. Το

ροσμαρινικό οξύ (RA) μπορεί να εξαχθεί από το *Rosmarinus officinalis* L.²⁰. Είναι ένα διμερές του καφεϊκού οξέος, που περιλαμβάνει τόσο το καφεϊκό οξύ όσο και το (R)-(+)-3-(3,4-διϋδροξυφαινυλο)γαλακτικό οξύ¹⁶. Το καρμινικό οξύ (carminic acid) είναι μια φυσική χρωστική ουσία υδροξυανθρακινόνης που χρησιμοποιείται στη φαρμακευτική βιομηχανία για την ικανότητά της να εξουδετερώνει τις ελεύθερες ρίζες και τα δραστικά είδη οξυγόνου (ROS)²¹. Η κουρκουμίνη (1,7-δισ(4-υδροξυ-3-μεθοξυφαινυλ)-1,6-επταδιεν-3,5-διόνη) είναι μια υδρόφοβη πολυφαινόλη που εξάγεται από το βότανο *Curcuma longa*, το οποίο χρησιμοποιείται συνήθως ως αντιοξειδωτικό στην παραδοσιακή ιατρική στην Κίνα και την Ινδία²².

Μια άλλη αξιοσημείωτη κατηγορία περιλαμβάνει τα χουμικά οξέα, τα οποία είναι φυσικά αντιοξειδωτικά που αποτελούνται από πολυφαινολικές ενώσεις, καρβοξυλικά οξέα, καρβονυλικές ομάδες και κινόνες, γνωστά για την ικανότητά τους να απομακρύνουν τις ελεύθερες ρίζες²³. Ένα από τα πιο εκτενώς μελετημένα φαινολικά οξέα είναι το γαλλικό οξύ (GA) (3,4,5-τριϋδροξυβενζοϊκό οξύ). Λόγω των ιδιαίτερων ιδιοτήτων του, το γαλλικό οξύ, το οποίο απαντάται φυσικά στα φυτά, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο τόσο στην ιατρική όσο και στη βιομηχανία τροφίμων²⁴ (**Εικόνα 1-2**). Το γαλλικό οξύ (GA), που χαρακτηρίζεται από το χαμηλό μοριακό του βάρος, θεωρείται ευρέως ως ένα ανώτερο φυσικό αντιοξειδωτικό, γνωστό για την αξιοσημείωτη ικανότητά του να εξουδετερώνει ελεύθερες ρίζες, να αναστέλλει την υπεροξείδωση των λιπιδίων και να χηλιώνει ιόντα μετάλλων. Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες του γαλλικού οξέος (GA) και η δράση του αποδίδονται στις τρεις υδροξυλομάδες του²⁵. Η επίπεδη δομή του, επιτρέπει στο γαλλικό οξύ (GA) να σχηματίζει ενδομοριακούς δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των υδροξυλομάδων του, ενισχύοντας τη χημική του σταθερότητα και την αντιοξειδωτική του αποτελεσματικότητα²⁶.



Εικόνα 1-2. Σχηματική απεικόνιση του μονομερούς του γαλλικού οξέος.

1.1.2.2. Βιταμίνες

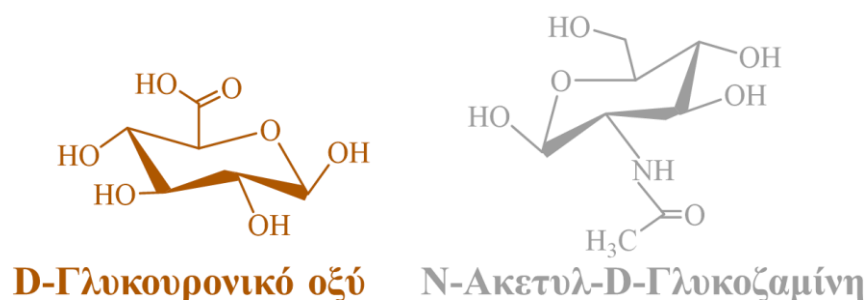
Η βιταμίνη E, είναι γνωστή και ως α-τοκοφερόλη, έχει αναγνωριστεί ως το πιο ισχυρό φυσικό λιπόφιλο αντιοξειδωτικό. Η αποτελεσματικότητά της απορρέει από την ικανότητά της να αναστέλλει την υπεροξειδωση των λιπιδίων μέσω μηχανισμών θραύσης της αλυσίδας στο κυτταρικό περιβάλλον ^{27,28}. Το Trolox, παρά το γεγονός ότι δεν ταξινομείται ως βιταμίνη, χρησιμοποιείται συχνά ως ανάλογο της α-τοκοφερόλης. Η κύρια διάκριση είναι η αντικατάσταση μιας πλευρικής αλυσίδας με μια πιο υδρόφιλη καρβοξυλική ομάδα. Το Trolox προτιμάται έναντι της α-τοκοφερόλης λόγω της υδατοδιαλυτότητάς του και της ανώτερης αντιοξειδωτικής του δράσης²⁷.

1.1.2.3. Φλαβονοειδή

Η κερκετίνη (quercetin) (2-(3,4-διϋδροξυφαινυλ)-3,5,7-τριϋδροξυ-4H-1-βενζοπυραν-4-όνη) είναι μια χαρακτηριστική φυσική φλαβονολική ένωση που χαρακτηρίζεται από τη δομή της, η οποία περιλαμβάνει πέντε ομάδες υδροξυλίου και μια ομάδα καρβονυλίου. Έχει την ικανότητα να σχηματίζει σύμπλοκα με διάφορα μεταλλικά ιόντα και παρουσιάζει σημαντική αντιοξειδωτική δράση ^{29,30}. Στα λαχανικά, η μορίνη (2',3,4',5,7-πενταϋδροξυφλαβόνη), που κατατάσσεται στις φαινολικές ενώσεις, υπόσχεται προστατευτικές επιδράσεις έναντι των καρδιαγγειακών παθήσεων ³¹. Επιπλέον η ρουτίνη (κερκετίνη-3-O-[α-L-ραμνόσυλ-(1→6)-β-D-γλυκοπυρανοσίδη) είναι ένα φυσικό φλαβονοειδές που βρίσκεται συνήθως στα εσπεριδοειδή, όπως τα πορτοκάλια και τα λεμόνια ³².

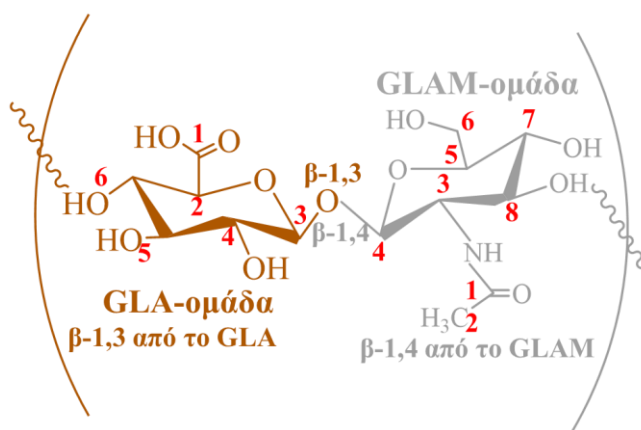
1.1.2.4. Πολυσακχαρίτες

Το υαλουρονικό οξύ (HyA), ένα φυσικό βιοπολυμερές γνωστό για τη βιοαποικοδομησιμότητά του, έχει συγκεντρώσει σημαντική προσοχή στον τομέα της ιατρικής τα τελευταία χρόνια λόγω των πολύπλευρων εφαρμογών του ³³. Στη χημική του δομή, το υαλουρονικό οξύ είναι ένας γραμμικός πολυσακχαρίτης που αποτελείται από επαναλαμβανόμενες μονάδες των μονοσακχαριτών D-γλουκουρονικό οξέος και N-ακετυλ-D-γλυκοζαμίνης (**Εικόνα 1-3**).



Εικόνα 1-3. Αριστερά φαίνεται η δομή του D-Γλυκουρονικού οξέος, ενώ δεξιά φαίνεται η δομή της N-Ακετυλ-D-Γλυκοζαμίνης.

Στη γλυκοζαμίνη, οι τέσσερις ομάδες υδροξυλίου (OH), καθώς και οι ίμινο ομάδες (NH) και αυτές του καρβονυλίου (CO), είναι προσανατολισμένες έτσι ώστε να διευκολύνουν τους διαμοριακούς δεσμούς υδρογόνου με τα άτομα οξυγόνου των γειτονικών μορίων. Υπάρχει ένας μόνο ενδομοριακός δεσμός υδρογόνου εντός του μορίου, συγκεκριμένα μεταξύ του ατόμου υδρογόνου της ομάδας O₄H και του ατόμου οξυγόνου της ομάδας O₃ ³⁴. Οι Palmer και Meyer το 1934 έδειξαν για πρώτη φορά την ακριβή δομή του υαλουρονικού οξέος, δηλαδή το ότι αποτελείται από το D-Γλυκουρονικό οξύ και την N-ακετυλ-D-γλυκοζαμίνη. Οι μονοσακχαρίτες συνδέονται μεταξύ τους με εναλλασσόμενους γλυκοσιδικούς δεσμούς β-1,3 και β-1,4 (**Εικόνα 1-4**) ³⁵.



Εικόνα 1-4. Το D-Γλυκουρονικό οξύ και η N-Ακετυλ-D-Γλυκοζαμίνη ενώνονται μεταξύ τους με β-1,3 και β-1,4 γλυκοσιδικούς δεσμούς, σχηματίζοντας το υαλουρονικό οξύ.

1.1.2.5. Καροτενοειδή και Πολυμερή

Τα καροτενοειδή είναι φυτοχημικά αντιοξειδωτικά που προέρχονται από διάφορα φρούτα και λαχανικά, όπως οι πατάτες και τα καρότα ¹³. Η χιτοζάνη, ένα κατιονικό πολυμερές που χρησιμοποιείται στη στοχευμένη χορήγηση φαρμάκων ³⁶, μπορεί να ληφθεί από θαλάσσιες και ζωικές πηγές, καθώς και από μανιτάρια και άλλους μύκητες ³⁷. Έχει αποκτήσει σημαντική σημασία λόγω των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών της ³⁸ και της βιολογικής της δραστηριότητας ³⁷. Τα υλικά με βάση τον άνθρακα επιδεικνύουν σημαντική δραστηριότητα στην δέσμευση ριζών υδροξυλίου και μπορούν να συντεθούν από διάφορες φυσικές πηγές ^{39,40}.

1.1.2.6. Ορυκτά- Μέταλλα

Εκτός από τα φαινολικά αντιοξειδωτικά, τις βιταμίνες και τα καροτενοειδή, τα μέταλλα μπορούν επίσης να επιδείξουν συγκεκριμένες αντιοξειδωτικές δραστηριότητες. Βασικά θρεπτικά συστατικά στον ανθρώπινο οργανισμό, όπως το σελήνιο (Se), προσφέρουν σημαντικά οφέλη και έχουν αποδειχθεί αποτελεσματικά στη θεραπεία του καρκίνου ⁴¹. Μεταξύ των ορυκτών, τα νανοσωματίδια χρυσού (Au NPs) παρουσιάζουν αξιοσημείωτη αντιοξειδωτική δράση ²⁸. Τα υλικά με βάση τον άνθρακα εμφανίζουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες λόγω των δομικών τους χαρακτηριστικών, ιδίως της παρουσίας sp^2 -υβριδισμένων ατόμων άνθρακα. Αυτοί οι sp^2 -υβριδοποιημένοι άνθρακες λειτουργούν ως αποτελεσματικές «παγίδες» για τις ελεύθερες ρίζες ⁴². Μεταξύ αυτών, ο συνγυκίτης είναι γνωστό ότι παρουσιάζει ειδική αντιοξειδωτική δράση ^{43,44}.

Τα τεχνητά νανοσωματίδια οξειδίου του δημητρίου, που συνήθως αναφέρονται ως νανοοξείδιο του δημητρίου, κατέχουν εξέχουσα θέση μεταξύ των βιομιμητικών νανοαντιοξειδωτικών λόγω των ιδιαίτερων φυσικοχημικών ιδιοτήτων τους. Ως οξείδιο των σπάνιων γαιών, η nanoCeO_2 είναι ικανή να δεσμεύει, να αποθηκεύει και να απελευθερώνει οξυγόνο στην επιφάνειά της, γεγονός που στηρίζει την αντιοξειδωτική της δράση ⁴⁵. Το άτομο του δημητρίου στο νανο οξείδιο του δημητρίου παρουσιάζει δύο σταθερές καταστάσεις οξείδωσης, Ce^{3+} και Ce^{4+} , που το διαφοροποιούν από τα άλλα λανθανίδια. Κατά συνέπεια, τα νανοσωματίδια CeO (CeONPs) παρουσιάζουν αυτοαναγεννώμενες ιδιότητες μέσω μιας εσωτερικής, συνεχούς οξειδοαναγωγικής μετατροπής μεταξύ Ce^{3+} και Ce^{4+} . Αυτός ο μηχανισμός οξειδοαναγωγής, ο οποίος μιμείται την ενζυμική δραστηριότητα, στηρίζει τις αντιοξειδωτικές, αντιραδιενεργές,

αντιβακτηριακές και αντικαρκινικές ιδιότητες των CeONPs. Αυτή η ιδιότητα, γνωστή ως ικανότητα αποθήκευσης οξυγόνου (OSC), διευκολύνει τις αντιδράσεις οξείδωσης/αναγωγής που είναι κεντρικές σε διάφορες εφαρμογές ⁴⁵. Τα νανοσωματίδια CeO (CeONPs) είναι ικανά να εξουδετερώνουν τα δραστικά είδη οξυγόνου (ROS) και τα δραστικά είδη αζώτου (RNS) λόγω της ενζυμικής τους δραστηριότητας ⁴⁶. Συγκεκριμένα, τα νανοσωματίδια CeO αξιοποιούν την εγγενή τους ικανότητα οξειδοαναγωγής για να απομακρύνουν τις ελεύθερες ρίζες που παράγονται στα υγιή κύτταρα ως αποτέλεσμα διαφόρων ενδογενών ή εξωγενών παραγόντων, μετριάζοντας έτσι τις πιθανές κυτταρικές βλάβες και αποτρέποντας τον κυτταρικό θάνατο ⁴⁷.

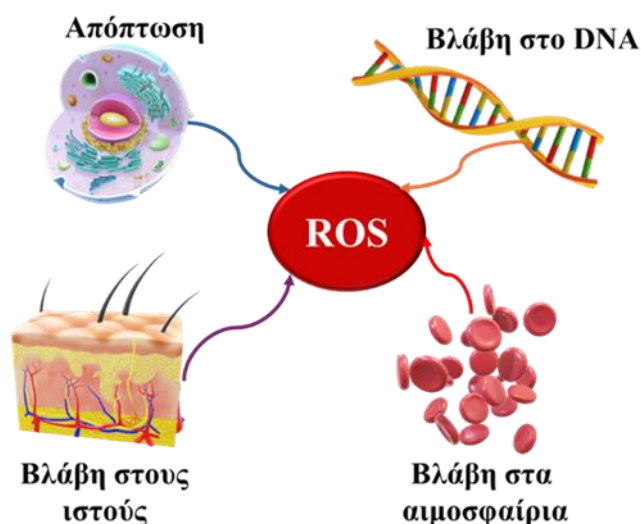
Τα οξειδωτικά είναι ιδιαίτερα δραστικές ενώσεις που μπορούν να προκαλέσουν βλάβες στα βιολογικά συστήματα υπό ορισμένες περιβαλλοντικές συνθήκες. Μια ισχυρή στρατηγική για τον μετριασμό αυτών των επιβλαβών επιδράσεων είναι η χρήση αντιοξειδωτικών. Τα αντιοξειδωτικά ασκούν τα προστατευτικά τους αποτελέσματα αλληλεπιδρώντας με τις ελεύθερες ρίζες, εξουδετερώνοντάς τις και σταματώντας τη διάδοση των επιβλαβών αλυσιδωτών αντιδράσεων, κυρίως μέσω της δωρεάς ηλεκτρονίων ⁸⁻¹⁰. Πληροφορίες περί ελεύθερων ριζών θα δοθούν εκτενώς στην ενότητα που ακολουθεί.

1.2. Δραστικά Είδη Οξυγόνου (ROS), Δραστικά Είδη Αζώτου (RNS), Ελεύθερες Ρίζες και άλλα Οξειδωτικά Είδη

Οι εξαιρετικά ενεργές μοριακές οντότητες, όπως είναι οι ελεύθερες ρίζες και τα δραστικά είδη οξυγόνου (ROS), διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε πολυάριθμες παθοφυσιολογικές διεργασίες ⁴⁸. Ένα άτομο ή μια μοριακή οντότητα που φέρει ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στην εξωτερική στοιβάδα, ορίζεται ως **ελεύθερη ρίζα** ⁴⁹. Στην κατηγορία των ελεύθερων ριζών περιλαμβάνονται τόσο τα δραστικά είδη οξυγόνου (ROS) όσο και τα δραστικά είδη αζώτου (RNS). Οι κύριες πηγές από τις οποίες προέρχονται οι ελεύθερες ρίζες είναι τόσο ενδογενείς (μιτοχόνδρια, κ.α.), όσο και εξωγενείς (αλκοόλ, καπνός, ρύπανση του περιβάλλοντος κ.α.) ⁵⁰. Οξειδοαναγωγικές διεργασίες καθώς και ομολυτικές και ετερολυτικές αντιδράσεις διάσπασης οδηγούν στην παραγωγή ελεύθερων ριζών ⁵¹. Οι ελεύθερες ρίζες υποτίθεται ότι χρησιμεύουν ως κεντρικοί ρυθμιστές στη διαμόρφωση ενός ευρέος φάσματος φυσιολογικών κυτταρικών διεργασιών ⁵². Τα αυξημένα επίπεδα δραστικών ειδών οξυγόνου και δραστικών ειδών αζώτου έχουν την ικανότητα

να αλληλεπιδρούν με βασικά βιομόρια, όπως τα λιπίδια, οι πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις μπορεί να προκαλέσουν δομικές και λειτουργικές τροποποιήσεις στα στοχευόμενα μόρια, με τελικό αποτέλεσμα την εκτεταμένη δυσλειτουργία και τραυματισμό των ιστών ⁵³.

Τα δραστικά είδη οξυγόνου (ROS) παράγονται συνήθως εντός των κυτταρικών δομών ωστόσο, οι ζωντανοί οργανισμοί διαθέτουν μια σειρά από ενζυμικούς και μη ενζυμικούς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς για τη ρύθμιση και τον μετριασμό των βλαβερών επιδράσεων αυτών των ειδών ⁵⁴. Το 1900, εισηγήθηκε για πρώτη φορά η ύπαρξη μιας οργανικής ελεύθερης ρίζας. Πιο συγκεκριμένα η ελεύθερη ρίζα ήταν η τριφαινυλομεθυλική ρίζα ($\text{Ph}_3\text{C}^\bullet$), η οποία ανιχνεύθηκε σε ζωντανά συστήματα. Το 1954, επιβεβαιώθηκε η παρουσία ελεύθερων ριζών σε βιολογικά συστήματα μέσω μελετών με τη χρήση Ηλεκτρονικού Παραμαγνητικού Συντονισμού (EPR), από τους Commoner et al ⁵⁵. Το οξειδωτικό στρες χαρακτηρίζεται από μια ανισορροπία μεταξύ της παραγωγής δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS) και της κυτταρικής ικανότητας συντονισμού ενός αποτελεσματικού αντιοξειδωτικού αμυντικού μηχανισμού. Αυτή η διαταραχή οδηγεί στη συσσώρευση μη αναστρέψιμων βλαβών στα κυτταρικά συστατικά, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών, των λιπιδίων και του DNA, με τελικό αποτέλεσμα τη μετάλλαξη και τον κυτταρικό θάνατο ⁴ (Εικόνα 1-5).



Εικόνα 1-5. Υψηλή συγκέντρωση των ελεύθερων ριζών προκαλεί επιβλαβείς επιδράσεις στους ιστούς και στα κύτταρα.

1.3. Κατηγορίες Ελεύθερων Ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ως εξής: (α) ρίζες με κέντρο το οξυγόνο ($\bullet\text{O}$), (β) ρίζες με κέντρο το άζωτο ($\bullet\text{N}$), (γ) ρίζες με κέντρο τον άνθρακα ($\bullet\text{C}$), (δ) ρίζες με κέντρο το θείο ($\bullet\text{S}$), (ε) ρίζες με κέντρο τον φώσφορο ($\bullet\text{P}$) και (ζ) ρίζες με κέντρο ένα αλογόνο⁵.

➤ Ρίζες με κέντρο τον άνθρακα ($\bullet\text{C}$)

Οι ρίζες με κέντρο τον άνθρακα (μονήρες ηλεκτρόνιο στον άνθρακα) ταξινομούνται ευρέως σε αρωματικές ή αλειφατικές ρίζες με κέντρο άνθρακα, και ρίζες με κέντρο άνθρακα με γειτονικό άτομο οξυγόνου. Οι αντιδράσεις που περιλαμβάνουν ρίζες με κέντρο το οξυγόνο και αλειφατικό άνθρακα μπορούν να οδηγήσουν στο σχηματισμό ριζών με κέντρο τον άνθρακα ($\bullet\text{C}$)⁵⁶. Όταν ένα μόριο μονοξειδίου του άνθρακα αποκτά ένα ηλεκτρόνιο, σχηματίζει το ριζικό ανιόν ($\text{CO}^{\bullet-}$). Αυτό το ριζικό ανιόν μπορεί στη συνέχεια να αντιδράσει είτε με ένα άλλο μόριο $\text{CO}^{\bullet-}$, είτε με ένα μόριο CO , οδηγώντας στο σχηματισμό δεσμών άνθρακα-άνθρακα⁵⁷. Οι ρίζες που περιλαμβάνουν ένα μονήρες ηλεκτρόνιο στον άνθρακα είναι ένα από τα πιο διαδεδομένα είδη ριζών⁵⁶ (**Εικόνα 1-6**).

➤ Ρίζες που έχουν ένα μονήρες ηλεκτρόνιο στο θείο ($\bullet\text{S}$), το φώσφορο ($\bullet\text{P}$) και τα αλογόνα

Οι ρίζες με κέντρο το φώσφορο, το θείο και ένα αλογόνο είναι διαδεδομένες χημικές οντότητες και έτσι απαιτείται η άμεση εξισορρόπησή τους στον οργανισμό για την μείωση της επιβλαβούς τους δράσης. Χαρακτηριστικά παραδείγματα το πιο πάνω ριζικών ενώσεων περιλαμβάνουν τις ρίζες χλωρίου ($\text{Cl}^{\bullet}$, $\text{Cl}_2^{\bullet-}$)⁵⁸ ή τη ρίζα τριθείου ($\text{S}_3^{\bullet-}$)⁵⁹ (**Εικόνα 1-6**).

➤ Ρίζες με κέντρο το οξυγόνο ($\bullet\text{O}$)

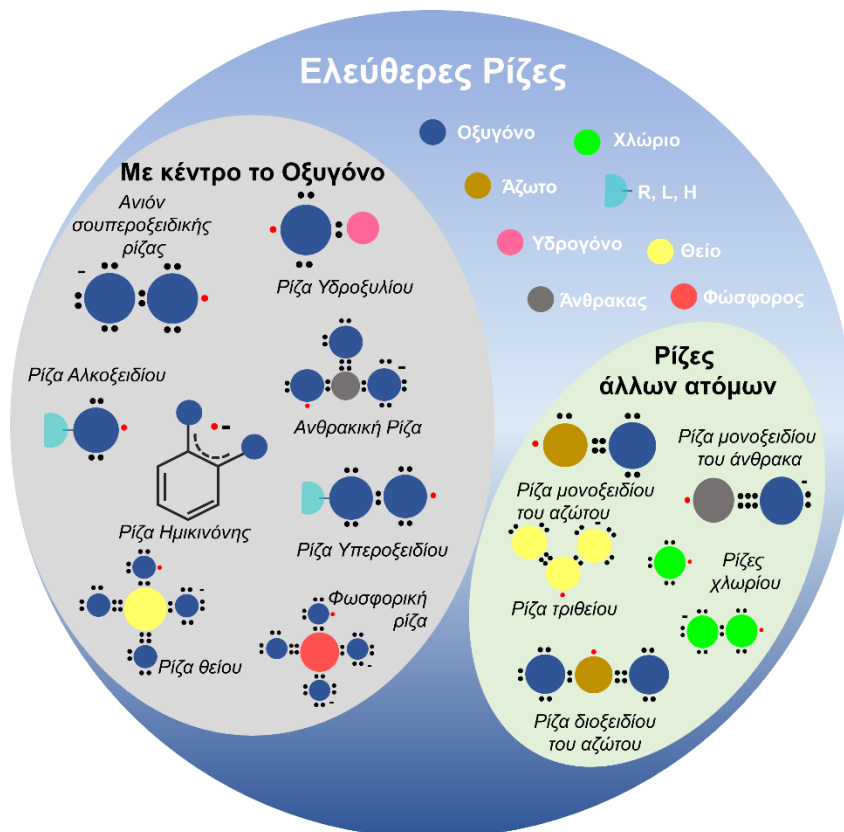
Τα δραστικά είδη οξυγόνου (ROS) αναφέρονται τόσο σε ριζικές όσο και σε μη ριζικές μορφές οξυγόνου που παρουσιάζουν υψηλή δραστικότητα. Τα αυξημένα επίπεδα ROS, που προέρχονται από κυτταρική δυσλειτουργία ή εξωτερικές πηγές, μπορούν να οδηγήσουν σε σημαντικές βλάβες που αποδίδονται στο οξειδωτικό στρες⁶⁰. Μεταξύ των επικρατέστερων ελεύθερων ριζών με

κέντρο το οξυγόνο, όπου το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο βρίσκεται στο άτομο του οξυγόνου, εντάσσονται οι ρίζες λιπιδικού υπεροξειδίου ($\text{LOO}^\bullet$)⁵⁰, ρίζες ημικινόνης ($\text{SQ}^\bullet$)⁶¹ καθώς και ανθρακικές ρίζες ($\text{CO}_3^\bullet$)⁶². Σε αυτή την κατηγορία ριζών ανήκουν τόσο οι ρίζες λιπιδικού αλκοξειδίου ($\text{LO}^\bullet$) όσο και οι αλκοξειδικές ρίζες ($\text{RO}^\bullet$)^{50,63}. Ένα από τα πιο γνωστά είδη ριζών μεταξύ των ROS είναι η ρίζα ανιόντων σουπεροξειδίου ($^\bullet\text{O}_2^-$), με χρόνο ημιζωής 1-1000 μs ή 10^{-6} s⁵⁰. Όταν η σουπεροξειδική ανιονική ρίζα αντιδράσει με το H^+ , τότε δημιουργείται μία πιο δραστική και επιβλαβής ρίζα, η ρίζα υδροϋπεροξειδίου ($\text{HO}_2^\bullet$) η οποία είναι ιδιαίτερα επιβλαβής στις κυτταρικές μεμβράνες⁵⁰ (Εικόνα 1-6) (Πίνακας 1-1).

Οι αλκυλ-υπεροξειδικές ρίζες ($\text{ROO}^\bullet$) διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην υπεροξείδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων και στις αντιδράσεις αυτοοξειδωσης των οργανικών υλικών⁶⁴. Από την άλλη πλευρά, το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) είναι ένα σημαντικό, σταθερό μόριο το οποίο ανήκει στην κατηγορία των μη ριζικών δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS)⁵⁰. Σε αυτή την κατηγορία περιλαμβάνονται επίσης τα σταθερά οργανικά υπεροξείδια (RCOOH)⁵⁰, το υποχλωριώδες οξύ (HOCl)⁵⁰ και το υποβρωμιώδες οξύ (HOBr)⁵⁰, τα οποία παρουσιάζουν σταθερότητα για αρκετά λεπτά. Επιπλέον, στην κατηγορία των ROS περιλαμβάνονται το μονήρες οξυγόνο ($^1\text{O}_2$, με χρόνο ημιζωής περίπου 10^{-6} δευτερόλεπτα)^{50,65}, το οποίο μπορεί να παραχθεί μέσω της οξείδωσης της βιταμίνης E⁶⁶, καθώς και το όζον (O_3 , με χρόνο ημιζωής μερικά δευτερόλεπτα). Ομοίως με τις ρίζες αλκοξειδίου και οι ρίζες φαινοξειδίου (π.χ. ρίζα τυροσίνης, $\text{Tyr}^\bullet$) είναι διαδεδομένες, ιδίως στα βιολογικά συστήματα^{67,68}. Στα είδη ριζών που διαθέτουν οξειδωτικές ικανότητες, ανήκουν οι φωσφορικές ρίζες ($\text{PO}_4^{2-\bullet}$)⁶³. Επιπλέον, στη κατηγορία των ROS ανήκουν και οι ρίζες θείου ($\text{SO}_4^\bullet$)⁶⁹, οι οποίες παράγονται μέσω της ενεργοποίησης των υπεροξυθειϊκών ανιόντων αλάτων, συμπεριλαμβανομένων των υπεροξυδιθειϊκών (PDS , $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$) και των υπεροξυμονοθειϊκών (PMS , HSO_5^-), που διακρίνονται από την παρουσία ενός δεσμού O-O που μοιάζει με το υπεροξείδιο του υδρογόνου⁷⁰.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι ρίζες υδροξυλίου ($^\bullet\text{OH}$)⁷¹, οι οποίες χαρακτηρίζονται από εξαιρετικά σύντομο χρόνο ημιζωής, περίπου 10^{-10} s⁵⁰. Λόγω του ότι οι ρίζες υδροξυλίου παρουσιάζουν το υψηλότερο δυναμικό αναγωγής ενός ηλεκτρονίου μεταξύ των δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS), εμφανίζουν και την μεγαλύτερη τάση να διαταράσσουν τις κυτταρικές

βιολογικές διεργασίες ^{51,72}. Οι ρίζες θείου που αναφέρθηκαν και προηγουμένως ($\text{SO}_4^{\bullet-}$) παρουσιάζουν υψηλότερο δυναμικό οξειδοαναγωγής σε σύγκριση με τις ρίζες υδροξυλίου ($\bullet\text{OH}$) ^{69,70} (Εικόνα 1-6) (Πίνακας 1-1).



Εικόνα 1-6. Οι ελεύθερες ρίζες είναι εξαιρετικά ενεργές οντότητες, επειδή διαθέτουν ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο και περιλαμβάνουν τόσο ρίζες με κέντρο το οξυγόνο (μερικές από τις οποίες είναι δραστικά είδη οξυγόνου, ROS) όσο και ρίζες χωρίς κέντρο το οξυγόνο, συμπεριλαμβανομένων των δομών με κέντρο το άζωτο (μερικές από τις οποίες είναι δραστικά είδη αζώτου, RNS), με κέντρο τον άνθρακα, με κέντρο το θείο, με κέντρο τον φώσφορο και με κέντρο ένα αλογόνο. (Εικόνα που τροποποιήθηκε από Fragou, F.; Theofanous, A.; Deligiannakis, Y.; Louloudi, M. Nanoantioxidant Materials: Nanoengineering Inspired by Nature. *Micromachines* 2023) ⁵.

Πίνακας 1-1. Λίστα δραστικών ριζών οξυγόνου και άλλων ατόμων

<u>Ρίζες με κέντρο το οξυγόνο ($\bullet\text{O}$)</u>	<u>Ρίζες άλλων ατόμων</u>
Ρίζα υδροξυλίου $\bullet\text{OH}$	Ρίζα μονοξειδίου του αζώτου $\bullet\text{NO}$
Υπεροξειδικές ρίζες $\text{HO}_2\bullet$, $\text{ROO}\bullet$ $\text{LOO}\bullet$	Ρίζα μονοξειδίου του άνθρακα $\text{CO}\bullet^-$
Ρίζα υπεροξειδικού ανιόντος $\bullet\text{O}_2^-$	Ρίζες χλωρίου $\text{Cl}\bullet$, $\text{Cl}_2\bullet^-$
Ρίζα ημικινόνης $\text{SQ}\bullet^-$	Ρίζα διοξειδίου του αζώτου $\bullet\text{NO}_2$
Ανθρακική ρίζα $\text{CO}_3\bullet$	Ρίζα τριθείου $\text{S}_3\bullet^-$
Ρίζες θείου/ φωσφόρου $\text{SO}_4\bullet^-$, $\text{PO}_4^{2\bullet-}$	
Αλκοξυ/ Φαινοξυ ρίζα $\text{RO}\bullet$, $\text{LO}\bullet$, $\text{Tyr}\bullet$	

➤ Ρίζες με κέντρο το άζωτο ($\bullet\text{N}$)

Τα δραστικά είδη αζώτου (RNS) είναι μια ορολογία που χρησιμοποιείται για να περιλάβει τόσο ριζικές όσο και μη ριζικές δραστικές μορφές αζώτου ⁷³. Παρόμοια με τα δραστικά είδη οξυγόνου (ROS), τα δραστικά είδη αζώτου (RNS) διαδραματίζουν απαραίτητο ρόλο στη ρύθμιση των φυσιολογικών διεργασιών των κυττάρων. Τα αυξημένα επίπεδα RNS μπορούν να προκαλέσουν κυτταρική βλάβη και απόπτωση. Τα δραστικά είδη αζώτου (RNS) περιλαμβάνουν μια ποικιλία ενώσεων που προέρχονται από το οξείδιο του αζώτου, συμπεριλαμβανομένου του ανιόντος νιτροξυλίου, S-νιτροδωθειόλες (RSNOs), το κατιόν νιτροδωνίου (NO^+) και δινιτρώδη

σύμπλοκα του σιδήρου, με εξαίρεση το NO_3^- ⁵⁰. Κατά τη διάρκεια παθολογικών καταστάσεων, το μονοξείδιο του αζώτου ($\bullet\text{NO}$) υφίσταται αντιδράσεις με διάφορα είδη, συμπεριλαμβανομένου του ανιόντος υπεροξειδίου (O_2^-), μέσω μιας οδού ανεξάρτητης από ένζυμα, οδηγώντας στο σχηματισμό υπεροξυνιτρώδους (ONOO^-), το οποίο μπορεί να προκαλέσει σημαντικές βλάβες στα κυτταρικά συστατικά ⁷⁴. Κοινά παραδείγματα ριζών με κέντρο το άζωτο περιλαμβάνουν τη ρίζα του μονοξειδίου του αζώτου ($\bullet\text{NO}$) (Εικόνα 1-6) (Πίνακας 1-1) και τη ρίζα του διοξειδίου του αζώτου ($\bullet\text{NO}_2$) ⁵⁰. Στην κατηγορία των μη ριζικών ενώσεων RNS ανήκουν, το τετροξείδιο του διαζώτου (N_2O_4), το τριοξείδιο του διαζώτου (N_2O_3), το κατιόν νιτρίου (NO_2^+), το υπονιτρώδες ανιόν (NO_2^-), το νιτρωδοϋπεροξειανθρακικό ανιόν (ONOOCO_2^-), το νιτρώδες οξύ (HNO_2), το νιτρολοχλωρίδιο (Cl-NO_2), το νιτροξύλιο (HNO), τα υπεροξυνιτρώδη (ONOO^-), το υπεροξυνιτρώδες οξύ (ONOOH) καθώς και τα αλκυλ-υπεροξυνιτρώδη (ROONO) ⁷⁴.

1.4. Μηχανισμοί δράσης των αντιοξειδωτικών υλικών.

Υπάρχουν πολλοί παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την αποτελεσματικότητα της δράσης των αντιοξειδωτικών, όπως: η συγκέντρωση, η φυσική τους κατάσταση, οι δομικές ιδιότητες, η θερμοκρασία στην οποία δρουν, η εξειδίκευση του υποστρώματος και πολλά άλλα. Η εγγενής ικανότητα ενός αντιοξειδωτικού να αλληλεπιδρά με τις ελεύθερες ρίζες και άλλα δραστικά είδη οξυγόνου, επηρεάζοντας έτσι την αντιοξειδωτική του ισχύ, διέπεται από τη χημική του δομή και το μικροπεριβάλλον. Επιπλέον, η συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού παίζει καθοριστικό ρόλο στον καθορισμό της αποτελεσματικότητάς του ⁷.

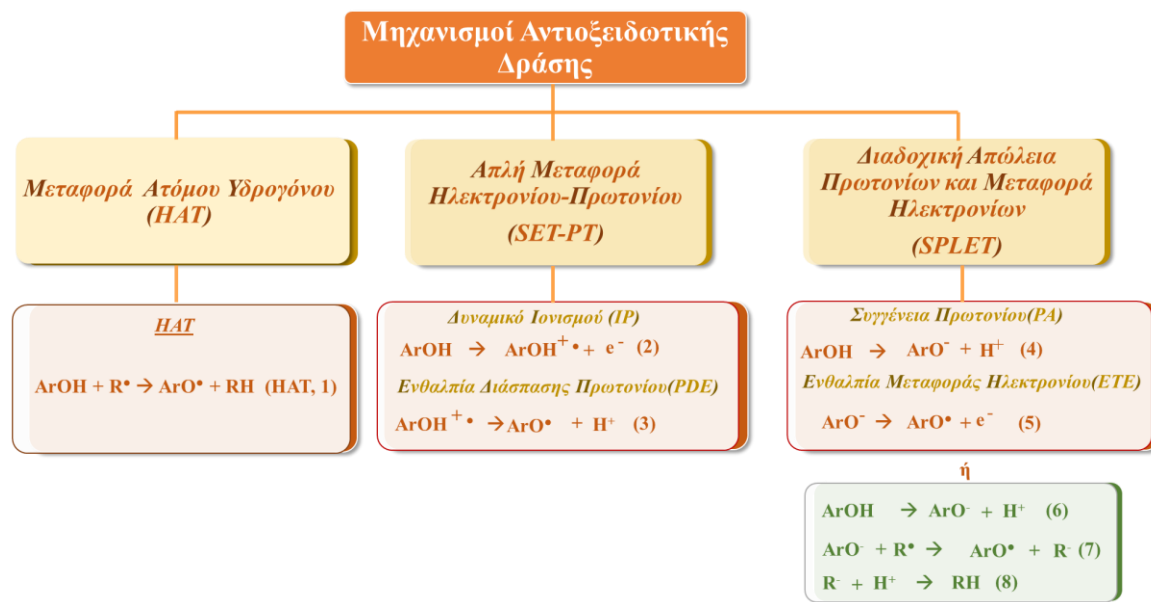
Το αρχικό στάδιο για την ανάπτυξη και την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας ενός αντιοξειδωτικού συστήματος περιλαμβάνει τον προσδιορισμό του μηχανισμού δράσης του. Ο πρωταρχικός στόχος είναι συνήθως η εξουδετέρωση επιβλαβών οντοτήτων, όπως τα δραστικά είδη οξυγόνου (ROS), ο οποίος μπορεί συχνά να επιτευχθεί μέσω πολλαπλών οδών ⁸. Σε μια πρόσφατη ανασκόπηση, οι Shah *et al*, ⁸ προτείνουν μια σχετική ταξινόμηση των αντιοξειδωτικών με βάση τους μηχανισμούς λειτουργίας τους. Σύμφωνα με την ταξινόμησή τους, τα αντιοξειδωτικά

μπορούν να λειτουργήσουν είτε ως παράγοντες πρόληψης βλαβών είτε ως αντιοξειδωτικά που διασπούν αλυσίδες. Οι μηχανισμοί πρόληψης ζημιών περιλαμβάνουν δραστηριότητες μίμησης ενζύμων, όπως εκείνες που μιμούνται την καταλάση (CAT), την υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) ή την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx)⁸. Τα αντιοξειδωτικά που διακόπτουν την αλυσίδα αναστέλλουν συγκεκριμένες αλυσιδωτές αντιδράσεις που προκαλούνται από ρίζες, όπως οι διαδικασίες αυτοοξειδωσης⁷⁵.

Γενικά, τα αντιοξειδωτικά μπορούν να εξουδετερώσουν τις ελεύθερες ρίζες μέσω τεσσάρων πρωταρχικών μηχανισμών⁷⁶:

- (i) Διαδοχική Απώλεια Πρωτονίων και Μεταφορά Ηλεκτρονίων (SPLET- Sequential Proton Loss Electron Transfer)
- (ii) Απλή Μεταφορά Ηλεκτρονίου- Πρωτονίου (SET-PT- Single Electron Transfer-Proton Transfer)
- (iii) Μεταφορά Ατόμου Υδρογόνου (HAT- Hydrogen Atom Transfer), Μεταφορά Ηλεκτρονίων Συζευγμένη με Πρωτόνιο (PCET- Proton Coupled Electron Transfer) **(Εικόνα 1-7)**^{77,78}.

Η μελέτη των Mayer *et al* ταξινομεί τους μηχανισμούς που περιλαμβάνουν τη μεταφορά ενός ηλεκτρονίου και ενός πρωτονίου σε ένα βήμα σε δύο κατηγορίες: Μεταφορά Ατόμου Υδρογόνου (HAT) και Μεταφορά Ηλεκτρονίου Συζευγμένη με Πρωτόνιο (PCET)⁷⁹. Οι μηχανισμοί Μεταφοράς Ατόμων Υδρογόνου (HAT) και Μεταφορά Ηλεκτρονίων Συζευγμένη με Πρωτόνιο (PCET) αποτελούν τις κύριες οδούς για την αντιοξειδωτική δράση, ενώ ο μηχανισμός Διαδοχικής Απώλειας Πρωτονίων και Μεταφοράς Ηλεκτρονίων (SPLET) μπορεί να θεωρηθεί υποσύνολο αυτών των κύριων μηχανισμών. Τα θεωρητικά εργαλεία, όπως οι υπολογισμοί της Θεωρίας Πυκνότητας DFT, μπορούν να παράσχουν κρίσιμες γνώσεις σχετικά με αυτές τις διαδικασίες⁷⁹.



Εικόνα 1-7. Η αντιοξειδωτική δράση μπορεί γενικά να κατηγοριοποιηθεί σε τρεις μηχανισμούς: (i) μεταφορά ατόμων υδρογόνου (HAT) και μεταφορά ηλεκτρονίων συζευγμένη με πρωτόνιο (PCET), (ii) απλή μεταφορά ηλεκτρονίων- πρωτονίων (SET-PT) και (iii) διαδοχική απώλεια πρωτονίων και μεταφορά ηλεκτρονίων (SPLET), σχήμα τροποποιημένο από (Fragou, F.; Theofanous, A.; Deligiannakis, Y.; Louloudi, M. Nanoantioxidant Materials: Nanoengineering Inspired by Nature. *Micromachines* 2023) ⁵.

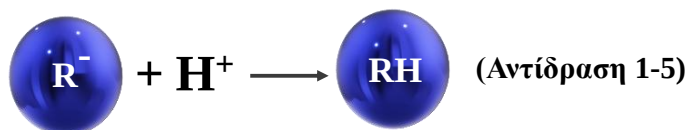
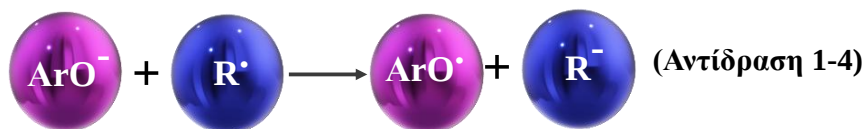
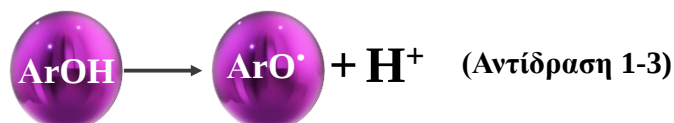
1.4.1. Μηχανισμός Διαδοχικής Απώλειας Πρωτονίων και Μεταφοράς Ηλεκτρονίων (SPLET)

Ένας από τους μηχανισμούς με τους οποίους ένα αντιοξειδωτικό μπορεί να δράσει είναι ο μηχανισμός SPLET. Η ενθαλπία του αρχικού σταδίου της αντίδρασης αντιστοιχεί στη συγγένεια πρωτονίου (PA) του φαινοξειδικού ανιόντος (**Αντίδραση 1-1**). Στο επόμενο στάδιο, από το ανιόν του φαινοξειδίου μεταφέρονται ηλεκτρόνια, με αποτέλεσμα το σχηματισμό μιας φαινοξυ-ρίζας. Η μεταβολή της ενθαλπίας που σχετίζεται με αυτό το βήμα αναφέρεται ως ενθαλπία μεταφοράς ηλεκτρονίου (ETE). Από την άποψη της αντιοξειδωτικής δράσης, τόσο ο μηχανισμός SPLET, όσο και οι μηχανισμοί HAT, έχουν ως αποτέλεσμα την *μεταφορά ενός ατόμου υδρογόνου στην ελεύθερη ρίζα* ⁸⁰. Η Διαδοχική Απώλεια Πρωτονίων και Μεταφορά Ηλεκτρονίων SPLET μπορεί να πραγματοποιηθεί σε δύο ή τρία στάδια. Στον μηχανισμό δύο βημάτων, το πρώτο βήμα

περιλαμβάνει την απώλεια ενός πρωτονίου (**Αντίδραση 1-1**), ακολουθούμενη από τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το πολυφαινολικό ανιόν (**Αντίδραση 1-2**). Ο μηχανισμός SPLET ευνοείται όταν το ανιόν (ArO^-) παρουσιάζει επαρκή σταθερότητα για να διευκολύνει τη μεταφορά ηλεκτρονίων πριν από την επαναπρωτονίωση.



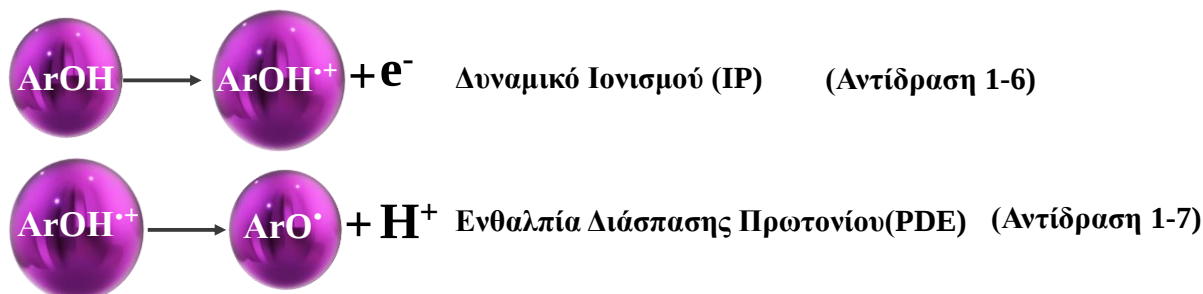
Αυτή η διαδικασία δύο βημάτων μπορεί να περιγραφεί και σε τρία στάδια όπως φαίνεται στις **Αντιδράσεις 1-3, 1-4 και 1-5**⁸¹.



1.4.2. Μηχανισμός Απλής Μεταφοράς Ηλεκτρονίου- Πρωτονίου (SET-PT)

Ένας πιθανός μηχανισμός δράσης των αντιοξειδωτικών είναι ο μηχανισμός Απλής Μεταφοράς Ηλεκτρονίου- Πρωτονίου. Σε αυτό τον μηχανισμό η ακολουθία περιλαμβάνει μια αρχική μεταφορά ηλεκτρονίων ακολουθούμενη από έναν μηχανισμό μεταφοράς πρωτονίων H^+ που εκτείνεται σε δύο στάδια. Στο πρώτο βήμα ($\text{ArOH} \rightarrow \text{ArO}^{\bullet+}$), παράγεται μια κατιονική ρίζα $[\text{ArOH}^{\bullet+}]$. Στο δεύτερο στάδιο, η κατιονική ρίζα υφίσταται αποπρωτονίωση ($\text{ArOH}^{\bullet+} \rightarrow \text{ArO}^{\bullet+} + \text{H}^+$). Το Δυναμικό Ιονισμού (**Αντίδραση 1-6**) και η Ενθαλπία Διάσπασης Πρωτονίου (**Αντίδραση 1-7**) αντιπροσωπεύουν τις ενθαλπικές μεταβολές που σχετίζονται με τον μηχανισμό SET-PT⁸⁰. Το

δυναμικό ιονισμού (IP) είναι η ενθαλπία που απαιτείται για την απόσπαση ενός ηλεκτρονίου. Η μεταβολή της ενθαλπίας που σχετίζεται με την αντίδραση αναφέρεται ως ενθαλπία διάσπασης πρωτονίου (PDE) ⁸².



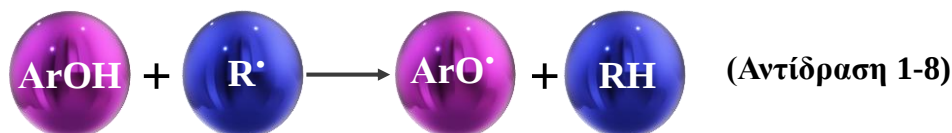
1.4.3. Μηχανισμός Μεταφοράς Ατόμου Υδρογόνου (HAT)

Ο Μηχανισμός μεταφοράς ατόμου υδρογόνου (HAT) είναι ένας θεμελιώδης και ευρέως διαδεδομένος αντιοξειδωτικός μηχανισμός τόσο σε χημικές όσο και σε βιολογικές διεργασίες. Ο μηχανισμός HAT λειτουργεί συχνά σε φαινολικά και πολυφαινολικά αντιοξειδωτικά συστήματα ⁸³. Κατά τη διεργασία HAT, το αντιοξειδωτικό προσφέρει ένα πρωτόνιο και ένα ηλεκτρόνιο, τα οποία μεταφέρονται μαζί ως ένα άτομο υδρογόνου, εξουδετερώνοντας έτσι την ελεύθερη ρίζα ⁷⁹. Οι αντιδράσεις HAT (**Αντίδραση 1-8**) είναι ηλεκτρονιακά αδιαβατικές λόγω της σχετικά μικρής απόστασης μεταφοράς ηλεκτρονίων, η οποία λαμβάνει χώρα σε μια μόνο ηλεκτρονιακή επιφάνεια. Σε θεμελιώδες επίπεδο, οι αντιδράσεις HAT χαρακτηρίζονται από τη μεταφορά τόσο ενός πρωτονίου όσο και ενός ηλεκτρονίου, γεγονός που τις καθιστά την απλούστερη κατηγορία διεργασιών Μεταφοράς Ηλεκτρονίων Συζευγμένη με Πρωτόνιο (PCET) ⁸⁴.

Παρόμοια με το μηχανισμό μεταφοράς ατόμου υδρογόνου (HAT), ο μηχανισμός μεταφοράς ηλεκτρονίων συζευγμένη με πρωτόνιο (PCET) συνεπάγεται την ταυτόχρονη μεταφορά ενός πρωτονίου και ενός ηλεκτρονίου μεταξύ διαφορετικών τροχιακών ⁷⁹. Οι χημικές διεργασίες παραγωγής ενέργειας και καυσίμων περιλαμβάνουν συχνά αντιδράσεις μεταφοράς ατόμου υδρογόνου (HAT) ή μεταφοράς ηλεκτρονίων συζευγμένη με πρωτόνιο (PCET). Για παράδειγμα ένα κρίσιμο βήμα στην καύση υδρογονανθράκων είναι η μεταφορά ατόμων υδρογόνου (HAT) ⁸³. Οι διεργασίες PCET είναι αναπόσπαστο μέρος πολλών χημικών αντιδράσεων στις οποίες εμπλέκονται αντιοξειδωτικά μόρια, όπως οι βιταμίνες C και E και είναι αντιδράσεις ζωτικής

σημασίας για την οξειδοαναγωγική διάλυση οξειδίων μετάλλων στο περιβάλλον. Ένα θεμελιώδες βήμα σε αυτές τις αντιδράσεις είναι η συζευγμένη μεταφορά ηλεκτρονίων και πρωτονίων. Οι αντιδράσεις συντονισμένης μεταφοράς ηλεκτρονίων/πρωτονίων (e^-/H^+) έχουν βρεθεί στο επίκεντρο εκτεταμένων πειραματικών και θεωρητικών ερευνών, επειδή αντιπροσωπεύουν τον πιο θεμελιώδη τύπο μεταφοράς ηλεκτρονίων συζευγμένη με πρωτόνιο (PCET) ⁸⁵. Οι διαφορές στις ενέργειες ενεργοποίησης αναφέρονται ως μεταβολές στις ενθαλπίες διάσπασης των δεσμών (BDE- Bond dissociation enthalpy) ⁸⁵. Μια χαμηλότερη τιμή ενθαλπίας διάσπασης του δεσμού (BDE) υποδηλώνει μεγαλύτερη ευκολία διάσπασης του ατόμου υδρογόνου ⁸⁰.

Κατά τον μηχανισμό HAT η ελεύθερη ρίζα σταθεροποιείται σε ένα ουδέτερο είδος, ενώ το αντιοξειδωτικό οξειδώνεται για να σχηματίσει μια ελεύθερη ρίζα ⁸⁶. Τα φαινολικά μόρια, για παράδειγμα, δίνουν ένα άτομο υδρογόνου σε ένα ριζικό υπόστρωμα, μετατρέποντάς το σε ένα μη ριζικό υπόστρωμα (όπως RH, ROH, ή ROOH), ενώ τα ίδια σχηματίζουν ένα ριζικό είδος ⁹. Οι αντιδράσεις HAT περιλαμβάνουν την ταυτόχρονη μεταφορά ενός ηλεκτρονίου και ενός πρωτονίου μεταξύ των αντιδρώντων, η οποία πραγματοποιείται σε ένα μόνο κινητικό βήμα (Αντίδραση 1-8) ⁸⁶.



Οι τρεις μηχανισμοί που περιεγράφηκαν παραπάνω, Μηχανισμός Διαδοχικής Απώλειας Πρωτονίων και Μεταφοράς Ηλεκτρονίων (SPLET), Μηχανισμός Απλής Μεταφοράς Ηλεκτρονίου- Πρωτονίου (SET-PT), Μηχανισμός Μεταφοράς Ατόμου Υδρογόνου (HAT)/ Μηχανισμός Μεταφοράς Ηλεκτρονίων Συζευγμένη με Πρωτόνιο (PCET), παρουσιάζουν παρόμοια θερμοδυναμική ισορροπία επειδή τα αντιδρώντα και τα προϊόντα έχουν ταυτόσημες μεταβολές της ελεύθερης ενέργειας Gibbs ($\Delta G^{\text{PCET}} = \Delta G^{\text{ET-PT}} = \Delta G^{\text{SPLET}}$). Ο ανταγωνισμός μεταξύ των διαφόρων μηχανισμών διέπεται από την κινητική του καθοριστικού βήματος του κάθε μηχανισμού (μεταφορά ατόμου για PCET και μεταφορά ηλεκτρονίου τόσο για ET-PT, όσο και για SPLET). Καθώς αυξάνεται η πολικότητα του διαλύτη ο μηχανισμός SET-PT γίνεται λιγότερο ευνοϊκός λόγω της αστάθειας της κατιονικής φαινολικής ρίζας ($\text{ArOH}^{\bullet+}$). Σε μη πολικά περιβάλλοντα όπως οι μεμβράνες λιπιδίων διπλών στιβάδων η διαδικασία PCET επικρατεί ως ο

κύριος μηχανισμός που είναι υπεύθυνος για τη διακοπή της αλυσιδωτής αντίδρασης της υπεροξειδωσής των λιπιδίων ⁸¹. Η αποκλειστική οδός για τις αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα σε συνθήκες χαμηλού pH, όπως οι αντιδράσεις στο στομάχι, είναι η υιοθέτηση της διεργασίας PCET ⁸¹.

1.5. Μέθοδοι αξιολόγησης της αντιοξειδωτικής δράσης

Η ακριβής ανίχνευση και ο ποσοτικός προσδιορισμός των διαφόρων ειδών ριζών είναι ουσιώδους σημασίας για τη χημεία των ριζών και για την ακριβή αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας. Απαιτούνται ακριβείς ποσοτικές μέθοδοι για την αποτελεσματική μέτρηση της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας. Οι χημικές μέθοδοι είναι γρήγορες, απλές και αυτοματοποιημένες καθώς προσφέρουν καθοριστικές πληροφορίες για την αξιολόγηση ενός αντιοξειδωτικού ⁷.

Η φασματοσκοπία παρέχει πολύτιμα εργαλεία για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης. Η αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης μπορεί να επιτευχθεί μέσω διαφόρων φασματοσκοπικών μεθόδων, όπως: (i) φασματοσκοπία φθορισμού, (ii) φασματοσκοπία EPR (Ηλεκτρονικού Παραμαγνητικού Συντονισμού) και (iii) φασματοσκοπία Υπεριώδους- Ορατού (UV-Vis). Οι πειραματικές μεθοδολογίες που χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε άμεσες και έμμεσες. Οι άμεσες μέθοδοι περιλαμβάνουν την ανίχνευση ειδών, όπως η ανίχνευση ριζών με τη χρήση EPR, ενώ μέσω των έμμεσων μεθόδων (δοκιμή DPPH), ανιχνεύονται φυσικοχημικές μεταβολές που προκύπτουν από μηχανισμούς δέσμευσης ριζών. Η επιλογή μιας μεθόδου αξιολόγησης καθοδηγείται πρωτίστως από τον συγκεκριμένο αντιοξειδωτικό μηχανισμό που ερευνάται. Για παράδειγμα, ο μηχανισμός μεταφοράς ατόμων υδρογόνου (HAT) μελετάται αποτελεσματικά μέσω της μεθόδου DPPH (Εικόνα 1-8) ⁸⁷.



Εικόνα 1-8. Φασματοσκοπικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης, (i) EPR, (ii) φθορισμός, (iii) UV-Vis (Υπεριώδες- Ορατό). (Σχήμα τροποποιημένο από Fragou, F.; Theofanous, A.; Deligiannakis, Y.; Louloudi, M. Nanoantioxidant Materials: Nanoengineering Inspired by Nature. *Micromachines* 2023) ⁵.

1.5.1. Αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω φασματοσκοπίας φθορισμού

1.5.1.1. Ικανότητα απορρόφησης ρίζας Οξυγόνου (ORAC: Oxygen Radical Absorbance Capacity)

Η μέθοδος ORAC (ικανότητα απορρόφησης ριζών οξυγόνου) είναι μια επαναστατική προσέγγιση που αποκτά ευρεία χρήση παγκοσμίως για την ποσοτικοποίηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας σε βιολογικά δείγματα και τρόφιμα. Η μέθοδος ORAC διακρίνεται από την ικανότητά της να ενσωματώνει τόσο το χρόνο αναστολής όσο και την έκταση αναστολής σε μια ενιαία ποσότητα. Στη μέθοδο αυτή είτε η β-φυκοερυθρίνη (β-PE), είτε η φλουορεσκεΐνη χρησιμεύει ως μόριο στόχος και ανιχνευτής φθορισμού. Ο φθορισμός ο οποίος μειώνεται παρουσία δεσμευτών ελεύθερων ριζών (δηλαδή αντιοξειδωτικών), ποσοτικοποιείται για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας. Η συγκεκριμένη μέθοδος περιλαμβάνει την αναστολή της επαγόμενης υπεροξυ-ριζικής οξείδωσης μέσω της θερμικής διάσπασης αζωενώσεων διϋδροχλωρικό 2,2-αζωβις(2-αμινοπροπάνιο) (AAPH). Τα αντιοξειδωτικά διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην αντίδραση αυτή αναστέλλοντας την οξειδωτική αποικοδόμηση του σήματος

φθορισμού της φλουορεσκεΐνης μέσω του μηχανισμού μεταφοράς ατόμου υδρογόνου (HAT).

Η μέθοδος αυτή ποσοτικοποιεί τη μείωση της έντασης του φθορισμού μιας καθορισμένης διάρκειας, η οποία οφείλεται στο σχηματισμό υπεροξυ ριζών που προκύπτουν από τη διάσπαση του διϋδροχλωρικού 2,2-αζωβις(2-αμινοπροπανίου) (AAPH) στους 37 °C. Η μείωση του φθορισμού παρατηρείται και καταγράφεται οπτικά κατά τη διάρκεια του πειράματος⁸⁸. Ένα από τα εξέχοντα αντιοξειδωτικά που χρησιμοποιούνται σε αυτή τη μεθοδολογία είναι το Trolox, γνωστό για την υδατοδιαλυτότητά του και το ρόλο του ως ισχυρού ρυθμιστή που ενισχύει την αναστολή του φθορισμού. Η ένταση του φθορισμού παρακολουθείται επί τριάντα λεπτά, με διέγερση στα 485 nm, ανίχνευση εκπομπής στα 538 nm και φίλτρο αποκοπής στα 530 nm. Καθ' όλη τη διάρκεια της εφαρμογής αυτής της μεθόδου η συγκέντρωση των αντιοξειδωτικών στο δείγμα συσχετίζεται άμεσα με την ένταση του φθορισμού. Η σχέση αυτή αξιολογείται με τη σύγκριση της ολοκληρωμένης περιοχής κάτω από την καμπύλη φθορισμού με προκαθορισμένες τιμές με τη χρήση του Trolox ως πρότυπου αναφοράς⁸⁸.

1.5.1.2. Παράμετρος Αντιοξειδωτικής Παγίδευσης των Ριζών (TRAP: Radical Trapping Antioxidant Parameter (TRAP) Assay)

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην προστατευτική δράση των αντιοξειδωτικών κατά τη διάρκεια μιας ελεγχόμενης αντίδρασης η οποία ποσοτικοποιείται μέσω της εξασθένησης του φθορισμού της R-Φυκοερυθρίνης⁸⁹. Η Παράμετρος Αντιοξειδωτικής Παγίδευσης των Ριζών (TRAP) ποσοτικοποιεί την αντιοξειδωτική ικανότητα ρύθμισης και αναστολής της αντίδρασης αντι-υπεροξειδωσης χρησιμοποιώντας διϋδροχλωρίδιο (2,2-αζωβις-2-μεθυλο-προπανιμιδαμίδιο) (AAPH: 2,2-azobis-2-methyl-propanimidamide)dihydrochloride) και 2,2-αζωβις (2-αμιδινοπροπάνιο)διϋδροχλωρίδιο (ABAP: 2,2-azobis (2-amidinopropane)dihydrochloride), ως πηγή ριζών⁹⁰. Η R-φυκοερυθρίνη (R-PE), η πιο έντονα φθορίζουσα χρωστική που ανακαλύφθηκε ποτέ και εξάγεται από την κόκκινη άλγη *Gracilaria*, χρησιμεύει ως ανιχνευτής φθορισμού⁸⁸. Η αντίδραση μεταξύ R-PE και AAPH παρακολουθείται φθορισμομετρικά ($\lambda_{ex}=495\text{nm}$, $\lambda_{em}=575\text{nm}$) για την καταγραφή της εξέλιξής της. Ο μηχανισμός μεταφοράς ατόμου υδρογόνου (HAT) διέπει τη συνολική TRAP μέθοδο, ενώ η οξείδωση παρακολουθείται με τη χρήση φθορισμομέτρου. Η αντιοξειδωτική ικανότητα μιας ένωσης αξιολογείται με σύγκριση του χρόνου καθυστέρησης της

εμφάνισης του οξειδωτικού ανιχνευτή παρουσία ενός δείγματος έναντι αυτού που παρατηρείται με το Trolox, μια πρότυπη ένωση αναφοράς ⁹⁰. Στη μέθοδο αυτή, ο φθορισμός της R-φυκοερυθρίνης αναστέλλεται από ABAP 2,2-αζωβις (2-αμιδινοπροπάνιο)διϋδροχλωρίδιο, το οποίο λειτουργεί ως εκκινητής ριζών ⁸⁹.

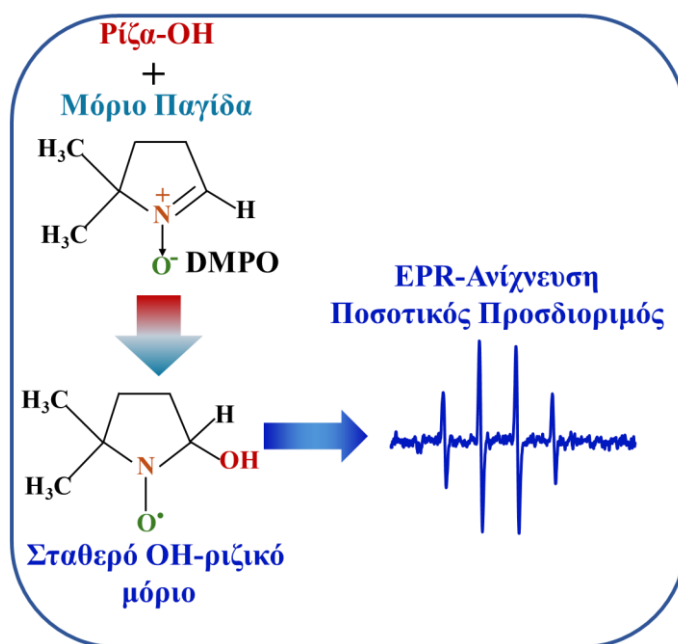
Άλλες μέθοδοι αξιολόγησης που αναφέρονται στη βιβλιογραφία περιλαμβάνουν την ικανότητα εξουδετέρωσης του υποχλωριώδους οξέος (HOCl)⁹¹, την άμεση ανίχνευση του μονήρους οξυγόνου (¹O₂)²¹, διαφόρους τύπους ανασταλμένων αντιδράσεων αυτοοξειδωσης⁶⁴ και συστήματα αντιδράσεων MV-Fenton⁹². Αναπτύχθηκε αναλυτική μέθοδος που χρησιμοποιεί την ακινητοποίηση ενός αντιοξειδωτικού στον άνθρακα ⁹³, καθώς και πιο βιώσιμες μέθοδοι αξιολόγησης ⁹⁴. Τέλος, η δοκιμασία της αναγωγής της γλουταθειόνης (GR) είναι μια ευρέως αποδεκτή τεχνική για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης ⁹⁵. Όλες οι πληροφορίες που συζητήθηκαν συνοψίζονται στην **Εικόνα 1-9**, η οποία περιγράφει τις μεθόδους αξιολόγησης της αντιοξειδωτικής δράσης των υλικών με τη χρήση φασματοσκοπίας φθορισμού.



Εικόνα 1-9. Πολλαπλές μεθοδολογίες για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης με τη χρήση φασματοσκοπίας φθορισμού. (Σχήμα τροποποιημένο από Fragou, F.; Theofanous, A.; Deligiannakis, Y.; Louloudi, M. Nanoantioxidant Materials: Nanoengineering Inspired by Nature. *Micromachines* 2023) ⁵.

1.5.2. Αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω φασματοσκοπίας Ηλεκτρονικού Παραμαγνητικού Συντονισμού (EPR)

Η φασματοσκοπία Ηλεκτρονικού Παραμαγνητικού Συντονισμού (EPR) είναι μια εξαιρετικά ευαίσθητη φασματοσκοπική τεχνική που χρησιμοποιείται για την άμεση ανίχνευση και ποσοτικοποίηση ειδών που διαθέτουν ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο. Η φασματοσκοπία EPR χρησιμοποιείται για την ανίχνευση ελεύθερων ριζών που προκαλούν οξειδωτικό στρες και κυτταρική βλάβη. Για την παρακολούθηση ριζών με πολύ μικρό χρόνο ημιζωής όπως οι ρίζες υπεροξειδίου ($\text{O}_2^{\bullet-}$) και υδροξυλίου ($\text{OH}^{\bullet}$), χρησιμοποιούνται μόρια παγίδες, όπως το οξείδιο της N-5,5-διμεθυλοπυρρολίνης (DMPO: 5,5-dimethyl-pyrroline N-oxide). Όταν το DMPO αντιδρά με τις πιο πάνω ρίζες δίνει ανιχνεύσιμα σήματα DMPO-OOH και DMPO-OH που παρέχουν ουσιαστικές πληροφορίες για την ανίχνευση και ανάλυση των ριζών (**Εικόνα 1-10**)^{96,97}.



Εικόνα 1-10. Σχηματική αναπαράσταση της αντίδρασης μεταξύ του οξειδίου της N-5,5-διμεθυλοπυρρολίνης (DMPO: 5,5-dimethyl-pyrroline N-oxide) και της ρίζας υδροξυλίου, που οδηγεί στο σχηματισμό του σταθερού μορίου DMPO-OH.

Είναι σημαντικό να διευκρινιστεί ότι ο Συντονισμός Σπιν Ηλεκτρονίων (ESR) αναφέρεται ειδικά σε περιπτώσεις με αμελητέες συνεισφορές σύζευξης σπιν-τροχιάς. Αντίθετα, ο Ηλεκτρονικός Παραμαγνητικός Συντονισμός (EPR) είναι ένας γενικότερος όρος που

περιλαμβάνει σημαντικές συζεύξεις σπιν-τροχιάς, όπως αυτά που αφορούν τα d- ηλεκτρόνια σε μέταλλα ή ρίζες με βάση το θείο ^{62,69}. Η φασματοσκοπία EPR προσφέρει ποσοτικές πληροφορίες για τα είδη ριζών με κατάλληλο πρότυπο σπιν όπως το DPPH. Η αντιοξειδωτική ικανότητα μπορεί να εκτιμηθεί χημικά, συνήθως συσχετιζόμενη άμεσα με τη μείωση των χαρακτηριστικών κορυφών του σήματος (**Εικόνα 1-10**) ⁹⁸.

1.5.3. Αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω φασματοσκοπίας Υπεριώδους-Ορατού (UV-Vis)

Μεταξύ των μεθόδων που χρησιμοποιούν τη φασματοσκοπία UV-Vis ως κύριο εργαλείο αξιολόγησης της αντιοξειδωτικής δράσης είναι η ανίχνευση των ριζών οξειδίου του αζώτου ($\bullet\text{NO}$), ανίχνευση της ρίζας $\text{ABTS}^{\bullet+}$, δοκιμή απορρόφησης του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2), ανίχνευση των ριζών υδροξυλίου ($\bullet\text{OH}$) και ανίχνευση των ριζών DPPH.

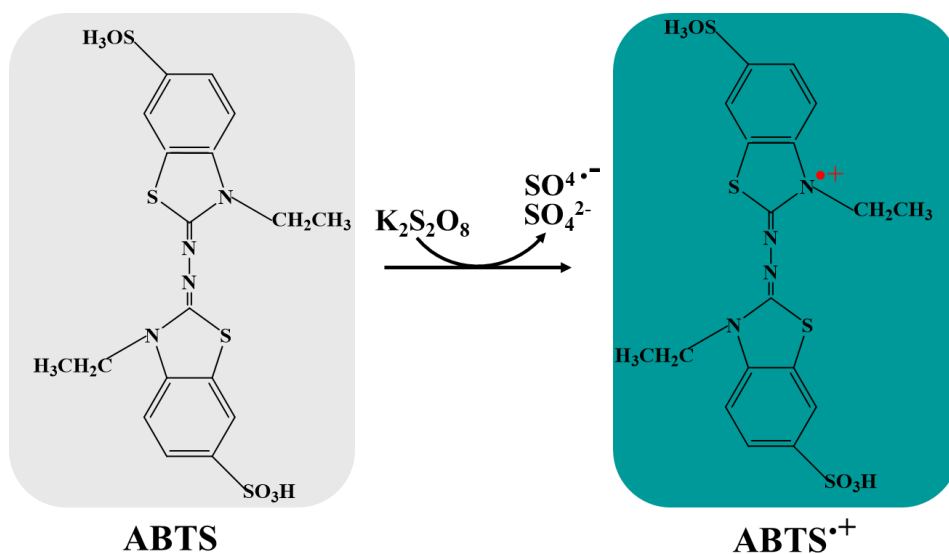
1.5.3.1. Μέθοδος Ικανότητας Δέσμευσης της ρίζας Μονοξειδίου του Αζώτου ($\bullet\text{NO}$: Nitric Oxide radical ($\bullet\text{NO}$) Scavenging Capacity Assay)

Η ρίζα του μονοξειδίου του αζώτου ($\bullet\text{NO}$), η οποία χαρακτηρίζεται από ένα μη δεσμικό ηλεκτρόνιο, παρουσιάζει σημαντική δραστηριότητα με συγκεκριμένες πρωτεΐνες και άλλες ελεύθερες ρίζες ⁹⁰. Η ρίζα $\bullet\text{NO}$ αναγεννάται στους βιολογικούς ιστούς από το ένζυμο συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου (NOS). Το ένζυμο αυτό καταλύει τον μεταβολισμό της αργινίνης σε κιτρουλίνη μέσω μιας οξειδωτικής αντίδρασης πέντε ηλεκτρονίων, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό της ρίζας του μονοξειδίου του αζώτου ($\bullet\text{NO}$) ⁸⁹. Στη μέθοδο αυτή, η *in vitro* αναστολή της ρίζας $\bullet\text{NO}$ χρησιμεύει ως δείκτης της αντιοξειδωτικής δράσης. Το νιτροπρωσσικό νάτριο σε ρυθμιστικό αλατούχο διάλυμα παράγει τη ρίζα $\bullet\text{NO}$, η οποία μπορεί να εξουδετερωθεί από τα αντιοξειδωτικά. Οι *in vitro* μέθοδοι μετρούν το εναπομένον $\bullet\text{NO}$ μετά την αντίδραση με τα αντιοξειδωτικά, ποσοτικοποιώντας το ως νιτρώδες. Επειδή μπορεί να σχηματιστεί $\bullet\text{NO}$ κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, πρέπει να αναχθεί σε νιτρώδες πριν από τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας. Παρουσία αντιοξειδωτικών ικανών να εξουδετερώνουν τη ρίζα, η αξιολόγηση της απορρόφησης του χρωμοφόρου πραγματοποιείται στα 546nm. Η αντιοξειδωτική ικανότητα εκφράζεται ως το ποσοστό μείωσης του μονοξειδίου του αζώτου ⁹⁰.

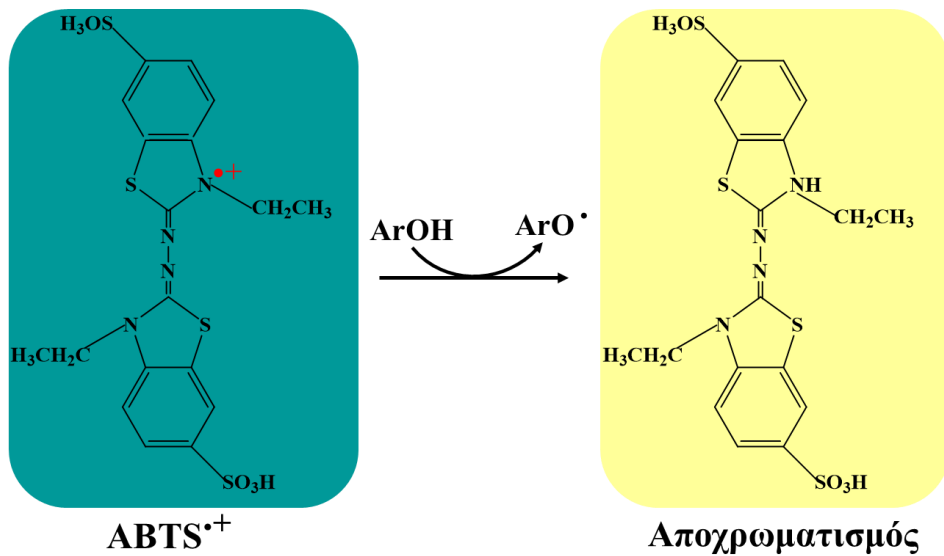
1.5.3.2. Ικανότητα Εξουδετέρωσης ριζών ABTS^{•+} ή Μέθοδος Ισοδύναμης Αντιοξειδωτικής Ικανότητας του Trolox (TEAC/ABTS^{•+})

Η ρίζα του ABTS^{•+} είναι σταθερή και διαλυτή τόσο στο νερό όσο και σε οργανικούς διαλύτες καθιστώντας την κατάλληλη για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας τόσο υδρόφιλων όσο και λιπόφιλων ενώσεων. Η μέθοδος αυτή επιδεικνύει καλή επαναληψιμότητα και απλότητα στην εκτέλεση. Τα αποτελέσματα συγκρίνονται με εκείνα μιας πρότυπης αντιοξειδωτικής ένωσης, αποκαλύπτοντας διαφορετικές κινητικές συμπεριφορές κατά τη διάρκεια της αντίδρασης⁹⁰. Η μέθοδος εξουδετέρωσης των ριζών ABTS^{•+} 2,2-αζινοδις-(3-αιθυλοβενζοθειαζολίνη-6-σουλφονικό), γνωστή και ως μέθοδος αποχρωματισμού κατιόντων ABTS^{•+} επιτρέπει την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας διαφόρων ενώσεων. Η μέθοδος αυτή είναι καθοριστική για τη διάκριση μεταξύ προσθετικών και συνεργιστικών επιδράσεων των αντιοξειδωτικών⁸⁹. Η συγκεκριμένη μέθοδος βασίζεται στην αλληλεπίδραση ανάμεσα σε ένα αντιοξειδωτικό, όπως το Trolox, και στο κατιόν της ρίζας ABTS^{•+}, το οποίο εμφανίζει ένα ξεχωριστό μπλε-πράσινο χρώμα με κορυφές απορρόφησης στα 645 nm, 734 nm και 815nm⁹⁰.

Η κατιονική ρίζα ABTS^{•+} δεν είναι διαθέσιμη στο εμπόριο και απαιτείται η παραγωγή της πριν από τη χρήση. Αυτό επιτυγχάνεται με την αντίδραση ενός οξειδωτικού παράγοντα, όπως το υπερθειικό νάτριο ή κάλιο ή MnO₂ με 2,2-αζινομπις-(3-αιθυλοβενζοθειαζολίνη-6-σουλφονικό) ABTS με αποτέλεσμα τον σχηματισμό της ρίζας ABTS^{•+}, η οποία χαρακτηρίζεται από το μπλε-πράσινο χρώμα της⁸⁸ (**Εικόνα 1-11**). Με την προσθήκη ενός αντιοξειδωτικού που λειτουργεί ως δότης ατόμου υδρογόνου η μπλε-πράσινη κατιονική ρίζα ABTS^{•+} υφίσταται αναγωγή (**Εικόνα 1-12**). Η αναγωγή αυτή ποσοτικοποιείται με την παρατήρηση της μείωσης των προεξεχουσών κορυφών του χαρακτηριστικού φάσματος απορρόφησης της ρίζας. Αντιοξειδωτικά όπως φλαβονοειδή, υδροξυκινναμινικά και καροτενοειδή, που προέρχονται από υδρόφιλες και λιπόφιλες ενώσεις, καθώς και εκχυλίσματα τροφίμων, μπορούν να συμμετάσχουν αποτελεσματικά σε αυτή τη μέθοδο^{88,90}. Η πιο ευρέως αναγνωρισμένη μέθοδος είναι η μέθοδος TEAC-II που είναι καλύτερη από τη μέθοδο TEAC-I. Στην μέθοδο TEAC-II, το κατιόν της ρίζας ABTS^{•+} σχηματίζεται απευθείας χωρίς την ανάγκη για μια ενδιάμεση ρίζα. Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει τον προσχηματισμό της κατιονικής ρίζας πριν την εισαγωγή του αντιοξειδωτικού στο σύστημα⁸⁸.



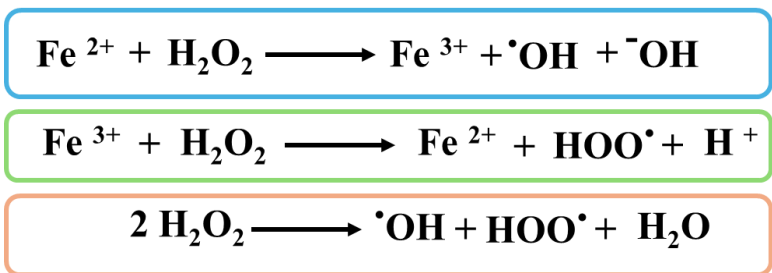
Εικόνα 1-11. Για να δημιουργηθεί η κατιονική ρίζα ABTS^{•+}, το ABTS πρέπει να υποστεί αντίδραση με υπερθειικό κάλιο και να επωαστεί στο σκοτάδι για αρκετές ώρες ώστε να εξασφαλιστεί ο ποσοτικός σχηματισμός της ρίζας (Εικόνα τροποποιημένη από το διαδίκτυο).



Εικόνα 1-12. Με την προσθήκη του αντιοξειδωτικού η ρίζα ABTS^{•+} ανάγεται με αποτέλεσμα την απώλεια του μπλε-πράσινου χρώματος της ρίζας και τον αποχρωματισμό της (Εικόνα τροποποιημένη από το διαδίκτυο).

1.5.3.3. Μέθοδος Δέσμευσης του Υπεροξειδίου του Υδρογόνου (H₂O₂: Hydrogen Peroxide Scavenging Assay)

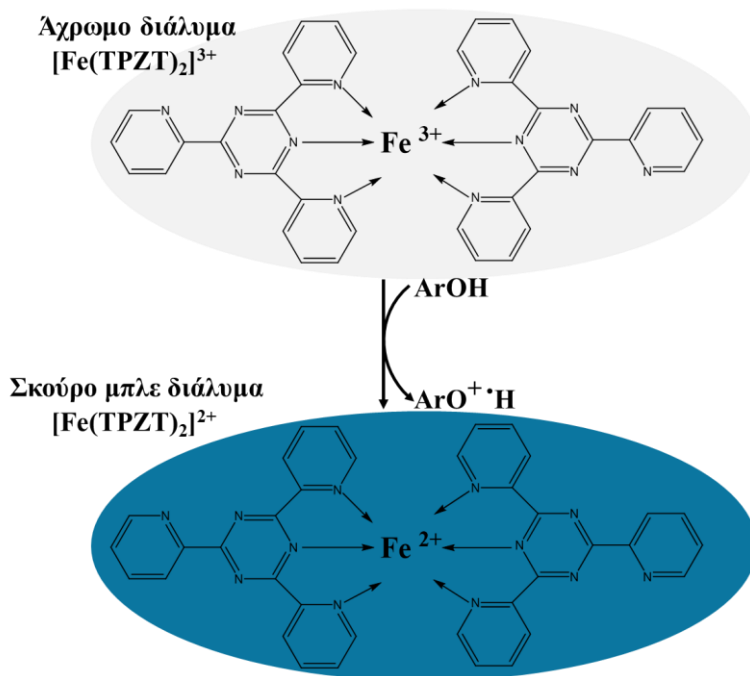
Το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂) παράγεται ενδογενώς μέσω της δράσης οξειδωτικών ενζύμων στους ζωντανούς οργανισμούς, που συνήθως διευκολύνεται υπό φυσιολογικές συνθήκες είτε με την υπεροξειδική δισμουτάση είτε μέσω της διάσπασης της ρίζας υπεροξειδίου⁹⁰. Το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂) μπορεί να εισέλθει στον οργανισμό μέσω διαφόρων οδών συμπεριλαμβανομένης της εισπνοής ατμών, της οφθαλμικής έκθεσης ή της δερματικής επαφής. Κατά την είσοδό του στον οργανισμό, το H₂O₂ υφίσταται ταχεία διάσπαση σε οξυγόνο και νερό οδηγώντας στην δημιουργία ριζών υδροξυλίου. Αυτές οι ρίζες εμπλέκονται σε διεργασίες όπως η υπεροξείδωση των λιπιδίων και η βλάβη του DNA⁸⁹. Μια ευρέως χρησιμοποιούμενη προσέγγιση για την αξιολόγηση της ικανότητας εξουδετέρωσης του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) περιλαμβάνει τη μέτρηση της απορρόφησής του στην περιοχή του υπεριώδους. Η ικανότητα ενός εκχυλίσματος να απομακρύνει το H₂O₂ συσχετίζεται άμεσα με την αντιοξειδωτική του αποτελεσματικότητα. Η μέθοδος αυτή συνεπάγεται τη δημιουργία ριζών υδροξυλίου in vitro χρησιμοποιώντας το σύστημα [Fe³⁺/ ασκορβικό/ EDTA/ H₂O₂] μέσω της αντίδρασης Fenton (Εικόνα 1-13)⁹⁰.



Εικόνα 1-13. Σχηματική απεικόνιση της αντίδρασης Fenton. Στην αρχική φάση της αντίδρασης, ο σίδηρος υφίσταται οξείδωση και από Fe²⁺ μετατρέπεται σε Fe³⁺, ταυτόχρονα με τη διάσπαση του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε ρίζα υδροξυλίου (•OH) και ανιόν υδροξυλίου (•OH⁻). Στην επόμενη φάση ο σίδηρος ανάγεται από Fe³⁺ σε Fe²⁺, ενώ το υπεροξείδιο του υδρογόνου διασπάται σε μια υδροϋπεροξειδική ρίζα (•OOH) και ένα πρωτόνιο (H⁺). Συνολικά, δύο μόρια υπεροξειδίου του υδρογόνου αντιδρούν παρουσία ιόντων Fe²⁺ και παράγουν μία ρίζα υδροξυλίου (•OH), μία υποροξειδική ρίζα (•OOH) και ένα μόριο νερού (H₂O) (Εικόνα τροποποιημένη από το διαδίκτυο).

1.5.3.4. Μέθοδος Αντιοξειδωτικής Αναγωγικής Ισχύος Του Σιδήρου (II) (FRAP: Ferric Reducing Antioxidant Power)

Οι Benzie και Strain εισήγαγαν την έννοια της συνολικής αντιοξειδωτικής δραστηρότητας, όπως ποσοτικοποιείται με τη μέθοδο αντιοξειδωτικής αναγωγικής ισχύος του σιδήρου (FRAP) ⁸⁵. Ουσιαστικά η μέθοδος αυτή αξιολογεί την ικανότητα του αντιοξειδωτικού να ανάγει το σίδηρο. Συγκεκριμένα, περιλαμβάνει την αναγωγή του συμπλόκου χλωριούχου σιδήρου 2,3,5-τριφαινυλο-1,3,4-τριαζο-2-αζωνικυκλοπέντα-1,4-διένιο (TPTZ) στη μορφή του σιδήρου (Fe^{2+}) υπό όξινες συνθήκες ⁸⁹. Αυτή η χρωματομετρική μέθοδος χρησιμοποιεί τα αντιοξειδωτικά ως αναγωγικά μέσα σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις, χρησιμοποιώντας μια απλή και οικονομικά αποδοτική φασματοφωτομετρική τεχνική. Η αντίδραση εξελίσσεται μέσω μεταφοράς ηλεκτρονίων και οι τιμές FRAP προσδιορίζονται ποσοτικοποιώντας την αύξηση της απορρόφησης στα 593nm (Εικόνα 1-14) ⁸⁸.



Εικόνα 1-14. Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου FRAP, όπου με την προσθήκη του αντιοξειδωτικού το άχρωμο διάλυμα της συμπλόκου Fe^{3+} , ανάγεται στο αντίστοιχο σύμπλοκο του Fe^{2+} και το χρώμα του διαλύματος μετατρέπεται σε σκούρο μπλε (Εικόνα τροποποιημένη από το διαδίκτυο).

Η ανάλυση περιλαμβάνει συνήθως τη σύγκριση της αντίδρασης είτε με ένα πρότυπο διάλυμα που περιέχει ιόντα σιδήρου (II), είτε με ένα πρότυπο αντιοξειδωτικό όπως το ασκορβικό οξύ. Υπό όξινες συνθήκες (pH 3.6), η τριπυριδυλοτριαζίνη σιδήρου (III) (Fe III TPTZ) ανάγεται στο σύμπλοκο με σίδηρο στην οξειδωτική κατάσταση (II) το οποίο εμφανίζει έντονο μπλε χρώμα (Εικόνα 1-14) και μπορεί να ποσοτικοποιηθεί με τη μέτρηση της μεταβολής της απορρόφησης στα 593nm. Η αλλαγή αυτή αντανακλά τη συνολική αναγωγική ισχύ λόγω της μεταφοράς ηλεκτρονίων που διευκολύνεται από τα αντιοξειδωτικά που υπάρχουν στο μίγμα της αντίδρασης. Το διάλυμα του θειϊκού σιδήρου χρησιμεύει ως πρότυπο αναφοράς σε αυτό το πλαίσιο ⁸⁸.

1.5.3.5. Δοκιμασία Αναστολής της Υπεροξείδωσης των Λιπιδίων/ Αναστολή των αντιδράσεων Αυτοοξείδωσης (Inhibiting Autoxidation Reactions/Lipid Peroxidation Inhibition)

Η υπεροξείδωση των λιπιδίων είναι ένας ευρέως αναγνωρισμένος μηχανισμός κυτταρικής βλάβης τόσο στα φυτά όσο και στα ζώα, που χρησιμοποιείται συνήθως ως δείκτης οξειδωτικού στρες σε κύτταρα και ιστούς ⁸⁸. Η διαδικασία αυτή είναι αυτοκαταλυτική που καταλήγει τελικά στον κυτταρικό θάνατο ⁸⁹. Η υπεροξείδωση των λιπιδίων χαρακτηρίζεται από αστάθεια και διασπάται σε μια πολύπλοκη σειρά ενώσεων, συμπεριλαμβανομένων των δραστικών καρβονυλοενώσεων. Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει την αντίδραση του χρωμογόνου αντιδραστηρίου N-μεθυλο-2-φαινυλοκυλινδόλη, με MDA και 4-υδροξυαλκεναλικές ενώσεις στους 45 °C. Κατά την αντίδραση αυτή, ένα μόριο MDA, ή 4-υδροξυαλκεναλικών ενώσεων αλληλεπιδρά με δύο μόρια N-μεθυλο-2-φαινυλοκυλινδόλης, σχηματίζοντας ένα σταθερό χρωμοφόρο (χρωστική καρβοκυανίνη) που παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση στα 568nm ⁸⁸.

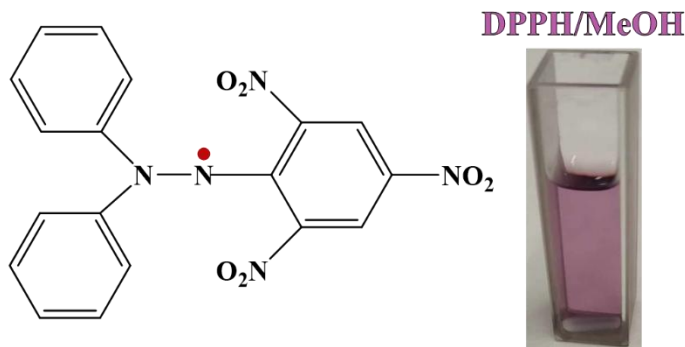
1.5.3.6. Αξιολόγηση της ικανότητας εξουδετέρωσης ριζών •OH μέσω φασματοσκοπίας UV-Vis

Η ικανότητα εξουδετέρωσης των ριζών υδροξυλίου (•OH) ενός αντιοξειδωτικού μπορεί να αξιολογηθεί χρησιμοποιώντας μια ειδική μέθοδο που περιλαμβάνει διαλύματα DMPO (200 mM) και H₂O₂ (10% v/v) που διαλύονται σε νερό Milli Q. Για να εκτιμηθεί η ικανότητα εξουδετέρωσης των ριζών υδροξυλίου του αντιοξειδωτικού Morin, το αντιοξειδωτικό διαλύεται σε διάλυμα

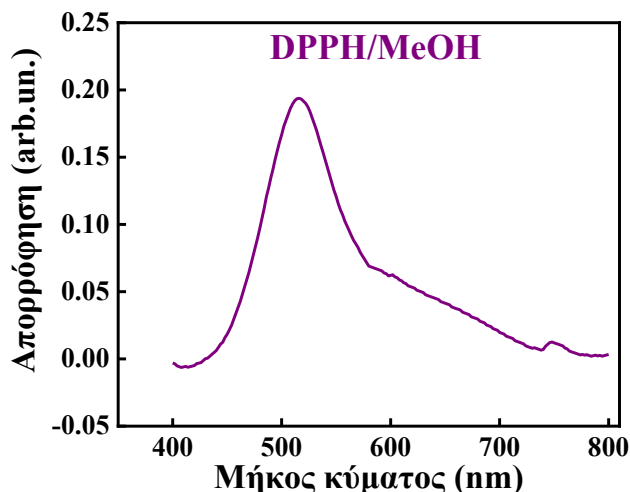
γλυκερίνης 10% v/v, το οποίο περιέχει μικρή ποσότητα αιθανόλης 0.11 mM. Παρασκευάζεται επίσης ένα διάλυμα ελέγχου, το οποίο περιέχει 200 mM DMPO, 10% υπεροξείδιο του υδρογόνου και 10 % γλυκερίνη. Αυτή η πορεία διευκόλυνε την ανίχνευση του μορίου DMPO-OH ως δεικτών αντιοξειδωτικής δράσης ³¹.

1.5.3.7. Αξιολόγηση της ικανότητας εξουδετέρωσης των ριζών DPPH (2, 2-διφαινυλο-1-πικρυλ-υδραζύλιο)

Το (2, 2-διφαινυλο-1-πικρυλ-υδραζύλιο) (DPPH) είναι ένα σταθερό μόριο που περιέχει μια αζωτοκεντρική ελεύθερη ρίζα (**Εικόνα 1-15**). Η ένωση αυτή παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον στην αξιολόγηση των αντιοξειδωτικών, επειδή το ιώδες χρώμα της εξασθενεί σε κίτρινο κατά την αναγωγή της, αποφεύγοντας την ανάγκη προηγούμενης παραγωγής της πριν από την ανάλυση ⁹⁹. Χρησιμοποιώντας τη ρίζα DPPH, μπορεί να εκτιμηθεί η ικανότητα ορισμένων ενώσεων να λειτουργούν έναντι των ελεύθερων ριζών ως δότες υδρογόνου, αξιολογώντας έτσι την αντιοξειδωτική τους δράση ¹⁰⁰. Η σταθερότητα της ρίζας DPPH καθιστά τη μέθοδο DPPH βολική, αξιόπιστη και οικονομικά βιώσιμη για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας ¹⁰¹. Στο φάσμα απορρόφησης UV-Vis παρατηρείται μια χαρακτηριστική κορυφή, η οποία αποδίδεται σε μεταπτώσεις π-π*, με σημαντική συμβολή μη δεσμικών ηλεκτρονίων, εμφανιζόμενη στο ορατό φάσμα σε μέγιστο μήκος κύματος $\lambda_{\max}$ περίπου 515nm (**Εικόνα 1-16**) ⁸⁹.

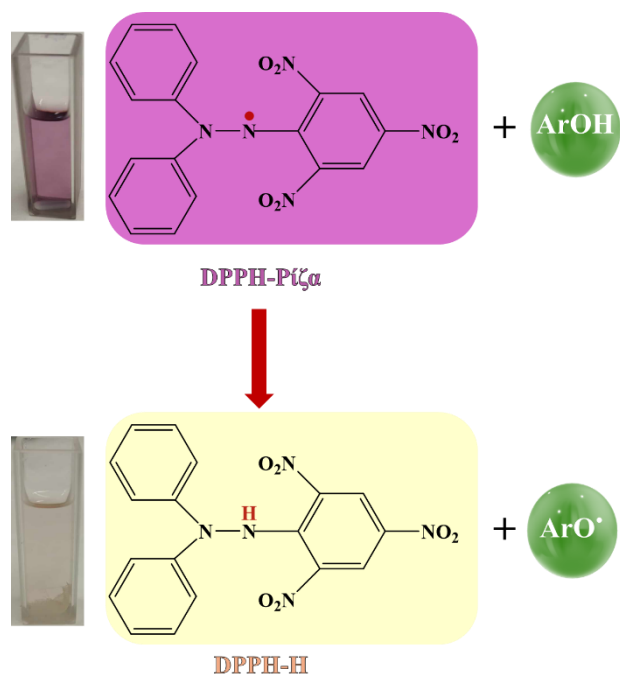


Εικόνα 1-15. Απεικόνιση της δομής της ρίζας του DPPH (2, 2-διφαινυλο-1-πικρυλ-υδραζύλιο) στα αριστερά και του χρώματος του διαλύματος της ρίζας DPPH σε διαλύτη μεθανόλη. Το χρώμα που δημιουργείται είναι βαθύ μωβ.

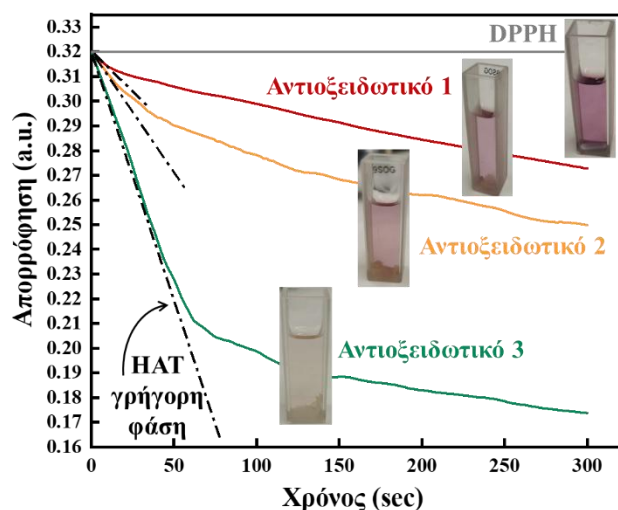


Εικόνα 1-16. Απεικόνιση φάσματος που υποδηλώνει την απορρόφηση του διαλύματος της ρίζας DPPH/MeOH στα 515 nm.

Η ρίζα DPPH διαθέτει τη μοναδική ιδιότητα να σταθεροποιεί το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο της μέσω μοριακών αλληλεπιδράσεων, αποτρέποντας έτσι τον διμερισμό, που είναι χαρακτηριστικό πολλών άλλων ελεύθερων ριζών ⁸⁹. Αυτή η ρίζα μπορεί να υποστεί αναγωγή δεχόμενη ένα άτομο υδρογόνου από μια ένωση δότη υδρογόνου, όπως ένα αντιοξειδωτικό με αποτέλεσμα το σχηματισμό της υδραζίνης DPPH-H. Κατά το σχηματισμό της υδραζίνης, η απορρόφηση στην ορατή περιοχή μειώνεται, οδηγώντας στην αλλαγή του χρώματος του διαλύματος από μωβ σε ανοιχτό κίτρινο (**Εικόνα 1-17**) ¹⁰². Η ταχεία μείωση της απορρόφησης της ρίζας DPPH χρησιμεύει ως μέτρο της αντιοξειδωτικής ικανότητας. Ένα πιο ισχυρό αντιοξειδωτικό παρουσιάζει ταχύτερη μείωση της απορρόφησης, υποδεικνύοντας αυξημένη αποτελεσματικότητα στην εξουδετέρωση των ελεύθερων ριζών μέσω του μηχανισμού Μεταφοράς Ατόμου Υδρογόνου (HAT) (**Εικόνα 1-18**) ¹⁰³.



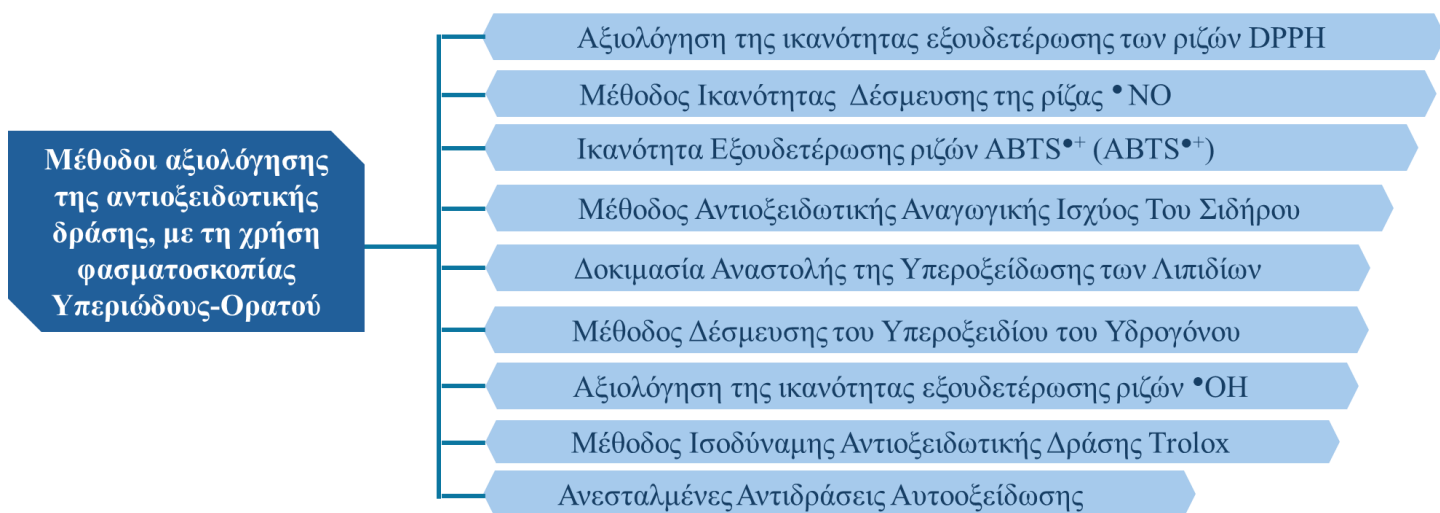
Εικόνα 1-17. Σχηματική απεικόνιση της αντίδρασης της ρίζας του DPPH με ένα φαινολικό αντιοξειδωτικό. Η ρίζα του DPPH μετατρέπεται σε υδραζίνη DPPH-H, ενώ το ίδιο το αντιοξειδωτικό μετατρέπεται σε ρίζα.



Εικόνα 1-18. Με την προσθήκη ενός αντιοξειδωτικού μειώνεται η απορρόφηση της ρίζας του DPPH, όπως φαίνεται από τις καμπύλες στο πιο πάνω σχήμα. Όσο καλύτερο είναι το αντιοξειδωτικό τόσο μεγαλύτερη είναι η καμπύλη, λόγω της μείωσης της απορρόφησης της ρίζας DPPH.

Η μέθοδος αξιολόγησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη χρήση της ρίζας DPPH είναι απλή και απαιτεί μόνο ένα φασματοφωτόμετρο UV-Vis. Η προσέγγιση αυτή λειτουργεί κυρίως με βάση την παραδοχή ότι η αντιοξειδωτική δράση συσχετίζεται με την ικανότητα παροχής ηλεκτρονίων. Αν και πρόκειται για μια απλή διεργασία χωρίς ειδική επεξεργασία του δείγματος, είναι ευαίσθητη και μπορεί να επηρεαστεί από διάφορους παράγοντες. Σε αυτούς περιλαμβάνονται: η φρεσκάδα του διαλύματος DPPH, η ποσότητα και ο τύπος του διαλύτη που χρησιμοποιείται καθώς και η συγκέντρωση των ατόμων υδρογόνου ⁷. Κατά τη φασματοφωτομετρική ανάλυση της ρίζας DPPH (2,2-διφαινυλ-1-πικρυλδραζύλιο), προκύπτει ένας σημαντικός περιορισμός λόγω των επικαλυπτόμενων φασμάτων των ενώσεων που απορροφούν στο ίδιο μήκος κύματος με το DPPH ⁷. Η ρίζα DPPH επιδεικνύει ελάχιστη διαλυτότητα σε μη πολικούς διαλύτες, αλλά παρουσιάζει σημαντική διαλυτότητα σε πολλούς πολικούς διαλύτες. Τις τελευταίες δύο δεκαετίες, αυτή η ρίζα έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς για την αποσαφήνιση των επιδράσεων της διαλυτότητας, για τον προσδιορισμό των ρυθμών αντίδρασης των αντιοξειδωτικών με τις ρίζες και για τη διευκόλυνση της ανάπτυξης νέων μηχανισμών μεταφοράς ηλεκτρονίων που περιλαμβάνουν φαινολικές ενώσεις ¹⁰².

Όλες οι μέθοδοι που αναφέρονται παραπάνω και χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση ενός αντιοξειδωτικού κυρίως μέσω της φασματοσκοπίας UV-Vis, αναφέρονται ονομαστικά στην (Εικόνα 1-19) που ακολουθεί.



Εικόνα 1-19. Στη βιβλιογραφία αναφέρονται πολλές μεθοδολογίες για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης χρησιμοποιώντας την φασματοσκοπία UV-Vis.

1.6. Τύποι Έκφρασης της αντιοξειδωτικής ικανότητας

Εκτός από τις διαφορετικές μεθόδους αξιολόγησης, υπάρχουν και διαφορετικοί τρόποι με τους οποίους μπορεί να εκφραστεί η αντιοξειδωτική ικανότητα ενός μορίου. Μεταξύ αυτών, περιλαμβάνονται η έκφραση της αντιοξειδωτικής ικανότητας άμεσα σε όρους συγκέντρωσης (mg αντιοξειδωτικών ή ριζών/L) ¹⁰⁴, ή σε ποσότητες εκφρασμένες σε χημικούς όρους (moles αντιοξειδωτικών/moles ριζών που έχουν εξουδετερωθεί) ⁸⁷. Τα αποτελέσματα μπορούν επίσης να επικεντρωθούν στην άμεση αντίχνευση δημιουργούμενων ελεύθερων ριζών από ένα υλικό και εκφράζεται ως moles ριζών/mg υλικού ⁹⁸.

Είναι σύνηθες να δηλώνονται οι αντιοξειδωτικές δράσεις με όρους μισής-μέγιστης αποτελεσματικής συγκέντρωσης (EC₅₀) ή ανασταλτικής συγκέντρωσης (IC₅₀), δηλαδή, η συγκέντρωση που απαιτείται για να επιτευχθεί δέσμευση των ριζών στο 50%. Οι τιμές EC₅₀ χρησιμοποιούνται συχνά για να εκφράσουν την αντιοξειδωτική ικανότητα μεταξύ διαφορετικών ενώσεων ¹⁰⁴. Η ισχύς ενός αντιοξειδωτικού μπορεί να εκφραστεί από τη χαμηλότερη τιμή EC₅₀ (ή IC₅₀) ¹⁰⁵. Στην περίπτωση της αξιολόγησης της ρίζας DPPH, το IC₅₀ μετρά τη μείωση της αρχικής συγκέντρωσης της DPPH όταν φτάσει στο μισό της, δηλαδή στο 50%, μετά την προσθήκη του αντιοξειδωτικού ¹⁰³. Η αντιοξειδωτική ικανότητα μιας ένωσης μπορεί γενικά να εκφραστεί ως επί τοις εκατό ικανότητα σάρωσης ριζών (% RSC). Το % RSC μπορεί να εκτιμηθεί από την **(Εξίσωση 1-1)** ⁴⁰.

$$\%RSC = \left(\frac{A_0 - A_1}{A_0} \right) * 100 \quad (\text{Εξίσωση 1-1})$$

όπου A₀ είναι η αρχική απορρόφηση, ενώ A₁ η απορρόφηση μετά την αντίδραση.

Η δική μας ομάδα ορίζει την αντιοξειδωτική δράση χρησιμοποιώντας φυσικοχημικές παραμέτρους όπως η τιμή n, η οποία μπορεί να υπολογιστεί με τρεις τρόπους ¹⁰⁶:

$$n_{ολικό} = \left(\frac{[DPPH \text{ ολ}]}{[Αντιοξειδωτικό]_0} \right)$$

$$n_{γρήγορο} = \left(\frac{[moles \text{ DPPH από HAT}]}{[Αντιοξειδωτικό]_0} \right)$$

$$n_{αργό} = \left(\frac{[moles \text{ DPPH από δευτερογενής αντιδράσεις}]}{[Αντιοξειδωτικό]_0} \right)$$

Επιπλέον, η φυσικοχημική μελέτη μπορεί να επεκταθεί χρησιμοποιώντας τη μελέτη Arrhenius, αφού η πρώτη προσέγγιση για τον προσδιορισμό του ρυθμού των χημικών αντιδράσεων έγινε μέσω του νόμου του ρυθμού αντίδρασης από τον Svante Arrhenius ¹⁰⁷. Η εξάρτηση του ρυθμού αντίδρασης από τη θερμοκρασία εκφράζεται μέσω της εξίσωσης Arrhenius (Εξίσωση 1-2) ¹⁰⁷.

$$k=A * e^{-Ea/RT} \quad (\text{Εξίσωση 1-2})$$

όπου, k: είναι η σταθερά ταχύτητας της αντίδρασης, και υπολογίζεται από την κλίση της καμπύλης, T: είναι η θερμοκρασία σε Kelvin, A: είναι ένας προεκθετικός παράγοντας, μια σταθερά για οποιαδήποτε χημική αντίδραση που καθορίζει τον ρυθμό της συχνότητας σύγκρουσης στη σωστή κατεύθυνση και, επιπλέον, είναι ένας παράγοντας που έχει ασθενή εξάρτηση από τον ρυθμό της ταχύτητας της αντίδρασης, Ea: είναι η ενέργεια ενεργοποίησης της αντίδρασης και μετριέται σε (Joules/mole) και το R συμβολίζει την παγκόσμια σταθερά αερίου σε (J/Kmol) ¹⁰⁷. Για τον ευκολότερο υπολογισμό της ενέργειας ενεργοποίησης, η εξίσωση Arrhenius μπορεί να γραφτεί με άλλο τρόπο, όπως σε λογαριθμική μορφή (Εξίσωση 1-3):

$$\ln k = \left(-\frac{Ea}{R}\right) * \left(\frac{1}{T}\right) + \ln A \quad (\text{Εξίσωση 1-3})$$

Οι διαφορές στις ενέργειες ενεργοποίησης συνήθως εκφράζονται ως οι διαφορές στις ενθαλπίες διάσπασης δεσμών (BDE) ⁸⁵. Όσο μικρότερη είναι η τιμή της ενθαλπίας αποσύνθεσης (Εξίσωση 1-4), τόσο πιο εύκολη είναι η διάσπαση του φαινολικού -OH ⁸⁰. Η εξίσωση που συνδέει την ενεργοποίηση με την ενθαλπία διάσπασης δεσμών φαίνεται παρακάτω (Εξίσωση 1-4):

$$Ea = \alpha BDE (ArOH) + \beta \quad (\text{Εξίσωση 1-4})$$

όπου α και β είναι σταθερές, η σταθερά α εξαρτάται από τη θέση της μεταβατικής κατάστασης κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, ενώ το ArOH συμβολίζει τα φαινολικά μόρια.

Τέλος, η αντιοξειδωτική δράση ενός μελετημένου συστήματος εκφράζεται συχνά σε ισοδύναμο τυπικών αντιοξειδωτικών συστημάτων αναφοράς. Έτσι, όροι όπως το ισοδύναμο GA (GAE) ¹⁰⁸ ή η αντιοξειδωτική δράση ισοδύναμου ασκορβικού οξέος συναντώνται συχνά.

1.7. Τεχνητά βιομιμητικά νανοαντιοξειδωτικά

Οι χαρακτηριστικές χημικές ιδιότητες των φυσικών αντιοξειδωτικών έχουν συμβάλει καταλυτικά στην ανάπτυξη συνθετικών βιομιμητικών συστημάτων. Αυτή η τεχνολογική στρατηγική επιδιώκει κυρίως να ενισχύσει την αποτελεσματικότητα και να μετριάσει τους εγγενείς δομικούς περιορισμούς των φυσικών αντιοξειδωτικών. Οι εξελίξεις στη νανοτεχνολογία έχουν οδηγήσει στην εμφάνιση νέων αντιοξειδωτικών παραγόντων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως προληπτικά ή θεραπευτικά μέσα κατά των διαταραχών που σχετίζονται με οξειδοαναγωγικά ρυθμιζόμενες κυτταρικές δυσλειτουργίες ¹⁴. Ταυτόχρονα αυτά τα υλικά, μπορούν να εξαλείψουν τα μειονεκτήματα των φυσικών αντιοξειδωτικών, όπως η ευαισθησία σε περιβαλλοντικούς παράγοντες, στο φως ή στο pH ¹⁵. Αυτά τα συνθετικά νανοαντιοξειδωτικά μιμούνται τους μηχανισμούς απορρόφησης ριζών των φυσικών αντιοξειδωτικών, που διευκολύνονται από τις χαρακτηριστικές λειτουργικές ομάδες που υπάρχουν στην επιφάνειά τους. Η νανομηχανική προσφέρει πολλαπλές εναλλακτικές μεθοδολογίες για την παρασκευή προηγμένων δομών, οι οποίες μπορούν να ενσωματωθούν σε ιατρικές και βιοτεχνολογικές εφαρμογές για την πρόληψη ή τη θεραπεία του καρκίνου, των διαταραχών που σχετίζονται με την ηλικία και των νευροεκφυλιστικών ασθενειών ⁸. Τέλος, η μίμηση καλά μελετημένων μηχανισμών που παρέχονται από τη φύση διασφαλίζει την αποτελεσματικότητα των παρασκευασμένων υλικών.

Τα βιομιμητικά τεχνητά αντιοξειδωτικά συστήματα περιλαμβάνουν νανοσωματίδια με εγγενείς αντιοξειδωτικές ιδιότητες και λειτουργικά νανοσωματίδια με ακινητοποιημένα αντιοξειδωτικά συστατικά ⁴⁷. Το νανο οξειδίο του δημητρίου (CeO_2), το οποίο υπάρχει τόσο ως φυσική όσο και ως τεχνητή αντιοξειδωτική νανοδομή, παρουσιάζει εγγενείς αντιοξειδωτικές ιδιότητες λόγω της ικανότητας των ατόμων του οξειδίου του δημητρίου να εναλλάσσονται μεταξύ των δύο καταστάσεων οξείδωσης ($\text{Ce}^{3+}/\text{Ce}^{4+}$) ¹⁰⁹. Ομοίως, τα νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα, συμπεριλαμβανομένων των νανοσωλήνων άνθρακα και των φουλερενίων, παρουσιάζουν σημαντική αντιοξειδωτική δράση ^{39,110}. Τέλος, η νανوسίλικα χρησιμοποιείται συνήθως ως αδρανής μήτρα σε βιομιμητικά νανοαντιοξειδωτικά συστήματα, είτε ως μήτρα στήριξης είτε ως επικάλυψη. Η ενσωμάτωσή της χρησιμεύει για τη βελτίωση της σταθερότητας, της βιοσυμβατότητας και τη μείωση της τοξικότητας ⁹⁸.

1.8. Βελτιστοποίηση αντιοξειδωτικών συστημάτων με βιομημητική νανομηχανική

Η βιομημητική νανομηχανική μπορεί να εφαρμοστεί μέσω επιφανειακών χημικών τροποποιήσεων με φυσικά αντιοξειδωτικά ή συνθετικά βιομημητικά αντιοξειδωτικά ή με την άμεση αντιγραφή των μηχανισμών των φυσικών αντιοξειδωτικών συστημάτων (Εικόνα 1-20).



Εικόνα 1-20. Διάφορες νανομηχανικές προσεγγίσεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανάπτυξη αντιοξειδωτικών νανοδομών, όπως: (i) η άμεση εξαγωγή νανοσωματιδίων από φυσικές πηγές, όπως τα νανοσωματίδια φυτικής προέλευσης- (ii) η μη ομοιοπολική τροποποίηση της επιφάνειας των νανοαντιοξειδωτικών για τη βελτιστοποίηση της απόδοσής τους- (iii) η σύνθεση νανοενζύμων - νανοσωματιδίων που μιμούνται ένζυμα με εγγενή αντιοξειδωτική δράση- και (iv) η ομοιοπολική τροποποίηση της επιφάνειας, η οποία περιλαμβάνει την ακινητοποίηση λειτουργικών τμημάτων σε νανοϋλικά στήριξης (Σχήμα τροποποιημένο από Fragou, F.; Theofanous, A.; Deligiannakis, Y.; Louloudi, M. Nanoantioxidant Materials: Nanoengineering Inspired by Nature. *Micromachines* 2023) ⁵.

Τα τεχνητά αντιοξειδωτικά μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε δύο τύπους: νανοϋλικά με ενσωματωμένες αντιοξειδωτικές λειτουργίες και νανοϋλικά με εγγενή αντιοξειδωτική δράση. Τα υβριδικά συστήματα νανομηχανικής παρέχουν πολυάριθμα πλεονεκτήματα, όπως [i] την επαγωγή

αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων σε αρχικά ανενεργά συστατικά, [ii] την ενίσχυση συνεργιστικών αποτελεσμάτων μεταξύ των συστατικών του υβριδικού συστήματος και [iii] τη ρύθμιση των ιδιοτήτων του υλικού υποστήριξης, όπως η ελαχιστοποίηση της τοξικότητας. Κατά το σχεδιασμό νέων αντιοξειδωτικών υλικών, είναι σημαντικό να λαμβάνονται υπόψη παράγοντες όπως η διαλυτότητα, η βιοδιαθεσιμότητα και η ασφάλεια ⁸⁰.

1.8.1. Υβριδικά νανοαντιοξειδωτικά μέσω μη ομοιοπολικής τροποποίησης

Υπάρχουν πολλές και διαφορετικές μέθοδοι σύνθεσης νανοϋβριδικών υλικών χωρίς να επέλθει ομοιοπολική σύζευξη. Για παράδειγμα, οι Sahiner *et al*, συνέθεσαν ένα αποτελεσματικό υβριδικό αντιοξειδωτικό, p(TA)-Si NPs, το οποίο περιελάμβανε ταννικό οξύ και νανοσωματίδια σίλικα ¹¹¹. Οι φυσικοχημικές ιδιότητες των υβριδικών αντιοξειδωτικών, συμπεριλαμβανομένου του μεγέθους των σωματιδίων, του προφίλ διασποράς, της ειδικής επιφάνειας (SSA) και των χαρακτηριστικών των πόρων, επηρεάζονταν από τη συγκέντρωση του ταννικού οξέος (TA) στα διάφορα υβριδικά υλικά αλλά και από το χρόνο αντίδρασης. Αυτά τα υβριδικά υλικά παρουσίασαν σημαντική δραστικότητα απορρόφησης ριζών (RSC) έναντι των ριζών ABTS ¹¹¹.

Επιπλέον, οι Salazar *et al*, συνέθεσαν καθαρά νανοσωματίδια Lu_2O_3 και τα ντοπάρισαν με Eu^{3+} Lu_2O_3 νανοσωματίδια με τη μέθοδο sol-gel ¹¹². Τα νανοφύλλα Ti_3C_2 MXene, επικαλυμμένα με υαλουρονικό οξύ, ντοπαμίνη (HA-DA) και πολυντοπαμίνη (PDA), έχουν αναπτυχθεί ως μη ενζυμικά νανοαντιοξειδωτικά. Τα υλικά αυτά έχουν σχεδιαστεί για να εξουδετερώνουν δραστικά είδη αζώτου (RNS) και δραστικά είδη οξυγόνου (ROS), συμπεριλαμβανομένων των H_2O_2 , $\text{O}_2^{\bullet}$ και $^{\bullet}\text{OH}$. Συμβάλλουν στη διατήρηση της ενδοκυτταρικής οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης, στη ρύθμιση του οξειδωτικού στρες και στην εξάλειψη των βακτηρίων για την πρόληψη της μόλυνσης ¹¹³.

Στο πλαίσιο αυτό, η τροποποίηση υλικών άνθρακα με ουσίες που παρουσιάζουν εγγενή βιολογική δραστικότητα έναντι των δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS) μπορεί να ενισχύσει σημαντικά τις αντιοξειδωτικές του ιδιότητες ⁴². Έχουν συντεθεί αντιοξειδωτικά με επικάλυψη πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG) και πολυβινυλοπυρρολιδόνης (PVP), σε νανοσωματίδια CuO και ZnO . Οι αντιοξειδωτικές δραστικότητες αυτών των επικαλυμμένων νανοσωματιδίων αξιολογήθηκαν με βάση την ολική περιεκτικότητα σε φλαβονοειδή και φαινολικά, τη συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα, τη συνολική αναγωγική ισχύ και την ποσοστιαία αναστολή των ριζών

DPPH. Οι εν λόγω δραστηρότητες ενισχύονται σημαντικά μετά τη διαδικασία της επικάλυψης^{114,115}. Επιπρόσθετα, τα νανοσωματίδια Fe₂O₃ (NPs) έχουν καθοριστική σημασία για τη βιοϊατρική τεχνολογία. Χρησιμοποιήθηκε μια απλή μέθοδος υδροθερμικής καταβύθισης για την ανάπτυξη ενός υβριδικού αντιοξειδωτικού Fe₂O₃/C, το οποίο συνδυάζει νανοσωματίδια οξειδίου του σιδήρου με ενθυλακωμένο γραφιτικό άνθρακα. Αυτό το υβριδικό υλικό παρουσίαζε εγγενείς υπερπαραμαγνητικές ιδιότητες¹⁰¹.

Πίνακας 1-2. Υβριδικά νανοαντιοξειδωτικά που αναπτύχθηκαν μέσω μη ομοιοπολικής τροποποίησης.

<u>Αντιοξειδωτικό</u>	<u>Ρίζα στόχος</u>	<u>Μέθοδος Αξιολόγησης</u>	<u>Μηχανισμός Δράσης</u>	<u>Αναφορές</u>
Fe ₃ O ₄ NPs	H ₂ O ₂	Δραστηρότητα τύπου υπεροξειδάσης	Βιομιμητική δράση GPx	116
MoS ₂ @TiO ₂	ROS	Ισχυρή βιονική διενζυμική δραστηρότητα	Βιομιμητική δράση SOD-CAT	117
Νανοςύνθετα CDs-CeO ₂	H ₂ O ₂	Ενζυμική δραστηρότητα	Βιομιμητική δράση CAT	118
(Χιτοζάνη) Cs-FeO	DPPH(•N), H ₂ O ₂	DPPH H ₂ O ₂	HAT	119
CUR-AuNPs AuNPs και συν-ακινητοποίηση με απομονωμένη κουρκουμίνη	DPPH(•N), H ₂ O ₂ •NO	DPPH H ₂ O ₂ NO	HAT	120
Λιπιδικός φορέας φορτωμένος με κουρσετίνη και έλαιο λιναρόσπορου (NLCS)	DPPH(•N)	DPPH	HAT	121
Εκχύλισμα τουρμενίου ενθυλακωμένο σε NLC, T-NLC	DPPH(•N)	DPPH	HAT	122

Στον πιο πάνω πίνακα παρατίθενται κάποια παραδείγματα υβριδικών νανοαντιοξειδωτικών που συντέθηκαν μέσω μη ομοιοπολικής τροποποίησης, των μεθόδων αξιολόγησης της αντιοξειδωτικής τους δράσης και των μηχανισμών δράσης τους (Πίνακας 1-2).

1.8.2. Νανο-ένζυμα

Τα νανοσωματίδια που είναι ικανά να μιμούνται ενζυμικές ιδιότητες αναφέρονται ως νανοένζυμα. Αυτά τα νανοένζυμα μπορούν να λειτουργήσουν ως υποκατάστατα των συμβατικών ενζύμων ⁹⁵. Ένα παράδειγμα που αναφέρθηκε στη βιβλιογραφία ήταν η ανάπτυξη ενός αντιοξειδωτικού νανοϋβριδικού υλικού με την ονομασία LCNP, το οποίο αποτελείται από νανοσωματίδια οξειδίου του δημητρίου (CeO_2) επικαλυμμένα με τον πολυσακχαρίτη levan (μονομερές φρουκτάνης) ¹²³. Οι νανοράβδοι και τα νανοσωματίδια τροποποιημένου με χρυσό οξειδίου του δημητρίου (CeO_2) αποτελούν άλλο ένα παράδειγμα νανοενζύμων, που παρουσιάζουν βελτιωμένη αντιοξειδωτική δράση, ενώ η ικανότητα απορρόφησης ριζών (RSC) μειώνεται όταν διαμορφώνονται ως νανοκύβοι ⁹². Τα νανοκαλώδια V_2O_5 που μιμούνται την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) έχουν συντεθεί μέσω υδροθερμικής μεθόδου, προσφέροντας κυτταροπροστασία έναντι οξειδωτικών βλαβών ⁹¹. Ομοίως, τα τροποποιημένα νανοσωματίδια Fe_3O_4 μπορούν να μιμηθούν τη δράση τύπου υπεροξειδάσης και, ως εκ τούτου, λόγω της αντίδρασης Fenton ($\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$), μπορούν να δράσουν κατά του H_2O_2 ¹²⁴. Τέλος, οι Ragg *et al*, διαπίστωσαν ότι, τα νανοσωματίδια του MoO_3 ακινητοποιημένα με ντοπαμίνη μιμούνται τη δράση της θειώδους οξειδάσης ¹²⁵.

1.8.3. Βιολογική νανομηχανική

Εκτός από τις συμβατικές μεθόδους μηχανικής, όπως η αφαίρεση με λείζερ, η χημική εναπόθεση ατμών, η εκτόξευση ιόντων, η χημική αναγωγή και η σύνθεση sol-gel, τα αντιοξειδωτικά νανοσωματίδια μπορούν επίσης να συντεθούν μέσω βιολογικών οδών ¹²⁶. Τα μεταλλικά νανοσωματίδια μπορούν να συντεθούν βιολογικά μέσω βακτηρίων, ζύμης, μυκήτων, φυτών ή φυκιών ¹²⁷. Αντιοξειδωτικά νανοσωματίδια αργύρου (Ag NPs) συντέθηκαν χρησιμοποιώντας εκχυλίσματα από το *Clerodendrum phlomidis*, μέλος της οικογένειας Lamiaceae. Το φυτό αυτό είναι γνωστό για τις αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητές

του, ιδιαίτερα στις τροπικές περιοχές ¹²⁸. Παρομοίως, βιοσυμβατές αντιοξειδωτικές κουκίδες άνθρακα έχουν παραχθεί από χυμό ντομάτας και έχουν αξιολογηθεί ως δεσμευτές ριζών DPPH ¹²⁹. Παρουσιάζουν αυξημένη αντιοξειδωτική ικανότητα σε σύγκριση με την υδροθερμικά λαμβανόμενη γλουταθειόνη (GCD) ¹²⁹.

1.8.4. Επιφανειακή χημική τροποποίηση υλικών με εμβολιασμό φυσικών αντιοξειδωτικών ή λειτουργικών συστατικών για την παραγωγή υβριδικών αντιοξειδωτικών

Η χημική τροποποίηση των επιφανειών των υλικών αποτελεί έναν επεκτεινόμενο ερευνητικό τομέα και μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μηχανική προσέγγιση για τον έλεγχο διαφόρων παραμέτρων των χημικών συστημάτων. Οι ιδιαίτερες ιδιότητες που προσδίδει στα αντιοξειδωτικά, σε συνδυασμό με τη λειτουργικότητα, επιτρέπουν την ανάπτυξη προηγμένων δομών προσαρμοσμένων για συγκεκριμένες εφαρμογές. Οι διεργασίες επιφανειακής ακινητοποίησης χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη ετερογενοποιημένων αντιοξειδωτικών δομών με στόχο [i] τη βελτιστοποίηση της εγγενούς αντιοξειδωτικής τους αποτελεσματικότητας, όπως η ικανότητα απορρόφησης ριζών (RSC) και η οξειδοαναγωγικά ρυθμιζόμενη απόδοση, [ii] την επαγωγή ή ενίσχυση πρόσθετων ιδιοτήτων, όπως η αντιβακτηριακή δράση, [iii] τη διαχείριση της πιθανής τοξικότητάς τους και των δυσμενών επιδράσεών τους στον άνθρωπο και το περιβάλλον και [iv] τον εξορθολογισμό της σύνθεσής τους για βελτίωση της σκοπιμότητάς τους για βιομηχανική παραγωγή ¹³⁰.

Η ακινητοποίηση μπορεί να προσεγγιστεί με διάφορους τρόπους. Μία μέθοδος περιλαμβάνει την ακινητοποίηση ενός λειτουργικού τμήματος σε μια αδρανή ανόργανη μήτρα για τη δημιουργία ενός υβριδικού υλικού που διατηρεί τις ιδιότητες του λειτουργικού μορίου, όπως η αντιοξειδωτική δράση. Ταυτόχρονα, το υλικό υποστήριξης μπορεί να έχει μη-λειτουργικό ρόλο, όπως η παροχή σταθερότητας, ή να συμβάλλει σε κάποιο συνεργιστικό αποτέλεσμα, προς την ενίσχυση της αντιοξειδωτικής ικανότητας.

Μια άλλη προσέγγιση για τροποποίηση της επιφάνειας μέσω ακινητοποίησης περιλαμβάνει τον εμβολιασμό ενός μη λειτουργικού τμήματος σε ένα δραστικό υλικό στήριξης για τη δημιουργία ενός υβριδικού υλικού. Αυτή η μέθοδος μπορεί [i] να προσφέρει

αντιοξειδωτικές ιδιότητες σε ένα αρχικά ανενεργό συστατικό του υβριδικού συστήματος ⁸⁷, [ii] να ενισχύσει τις συνεργιστικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των συστατικών του υβριδικού συστήματος ¹⁹, [iii] να τροποποιήσει τις ιδιότητες του υλικού υποστήριξης, όπως η μείωση της τοξικότητάς του, ή [iv] να αντιμετωπίσει εγγενείς δομικούς περιορισμούς, όπως η συσσωμάτωση. Λειτουργικές ομάδες, όπως -COOH, -NH₂, -OH και -SH, μπορούν να αλληλεπιδράσουν με βιοδραστικούς υποκαταστάτες και να ενσωματωθούν σε διεργασίες όπως η προσθήκη υποκαταστάτη, η ανταλλαγή υποκαταστάτη ή η ενθυλάκωση ¹³⁰.

Διάφορα πρωτόκολλα ακινητοποίησης έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη μιας σειράς προηγμένων αντιοξειδωτικών δομών. Αυτές περιλαμβάνουν υβριδικά συστήματα πυρήνα-κελύφους, τα οποία ενσωματώνουν φυσικά αντιοξειδωτικά μέσω ακινητοποίησης σε σωματίδια. Τα συστήματα που περιγράφονται επιλέχθηκαν με βάση την αξιολόγησή τους ως αντιοξειδωτικά, ώστε να διευκολυνθεί η συγκριτική ανάλυση της αποτελεσματικότητας διαφόρων υβριδικών αντιοξειδωτικών συστημάτων. Μερικά παραδείγματα τέτοιων υβριδικών υλικών συνοψίζονται στον πιο κάτω πίνακα (**Πίνακας 1-3**) μαζί με τους μηχανισμούς και τις μεθόδους αξιολόγησης της αντιοξειδωτικής τους δράσης.

Πίνακας 1-3. Λίστα υβριδικών αντιοξειδωτικών υλικών που αναπτύχθηκαν μέσω επιφανειακής χημικής τροποποίησης μαζί με τις μεθόδους αξιολόγησης της αντιοξειδωτικής τους δράσης και τους μηχανισμούς δράσης τους.

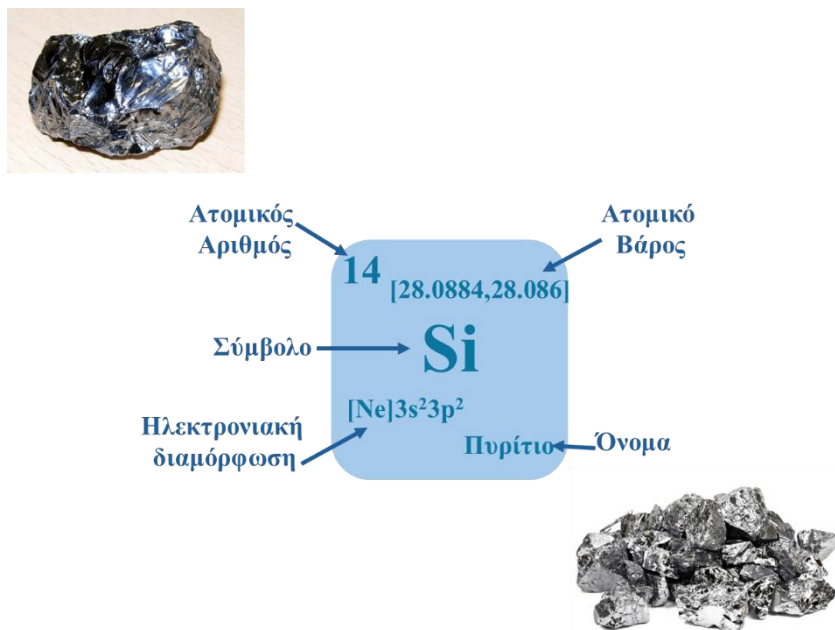
<u>Αντιοξειδωτικό</u>	<u>Ρίζα στόχος</u>	<u>Μέθοδος Αξιολόγησης</u>	<u>Μηχανισμός Δράσης</u>	<u>Αναφορές</u>
Γαλλικό οξύ σε νανοσωματίδια SiO ₂ (SiO ₂ @GA)	DPPH (•N)	DPPH	HAT n _{fast}	106
Μεσοπορώδη νανοσωματίδια της SiO ₂ (MSN) με ακινητοποιημένη μορίνη AMSNPs- MOR	•OH, ¹ O ₂	Ρίζες υδροξυλίου Μονήρες οξυγόνο	PCET	31

Au NPs με ενσωματωμένη 3,6 διυδροξυφλαβόνη, λουτεΐνη και σεληνιούχα μεθυλοσεληνοκυστεΐνη	$\bullet\text{N}$, $\bullet\text{OH}$, H_2O_2 , $\bullet\text{NO}$	DPPH, Ρίζες υδροξυλίου, υπεροξειδίο του υδρογόνου, μονοξειδίο του αζώτου	HAT	99
Ag-Se διμεταλλικό	DPPH ($\bullet\text{N}$), ABTS $\bullet^+$	DPPH, ABTS	HAT	131
Νανοσωματίδια Ag επικαλυμμένα με SiO_2	DPPH($\bullet\text{N}$)	DPPH	HAT, PCET	132
ACSSNs-CA Αμινοτροποποιημένα μεσοπορώδη νανοσωματίδια σίλικα με ακινητοποιημένο καφεϊκό οξύ	DPPH($\bullet\text{N}$)	DPPH	SPLET	15
Se@Trolox	ABTS $\bullet^+$	ABTS	HAT	41
SiO_2 -HALP NPs Φυσικά χουμικά πολυμερών οξέων, Humic Acid Like Polycondesates ακινητοποιημένα σε SiO_2 NPs	DPPH($\bullet\text{N}$)	DPPH	HAT	23
HNT-Trolox/Que	DPPH ($\bullet\text{N}$), $\text{ROO}\bullet$	DPPH	HAT	133
V_2O_5 @pDA@ MnO_2 Ακινητοποίηση	ROS	Βιομιμητική δράση GPx	Βιομιμητική δράση SOD-	134

νανοκαλωδίων V_2O_5 σε νανοσωματίδια MnO_2 με τη βοήθεια ντοπαμίνης			CAT	
GLA@SiO ₂ @GLAM, SiO ₂ @GLA, SiO ₂ @GLAM	DPPH(•N)	DPPH	HAT	87

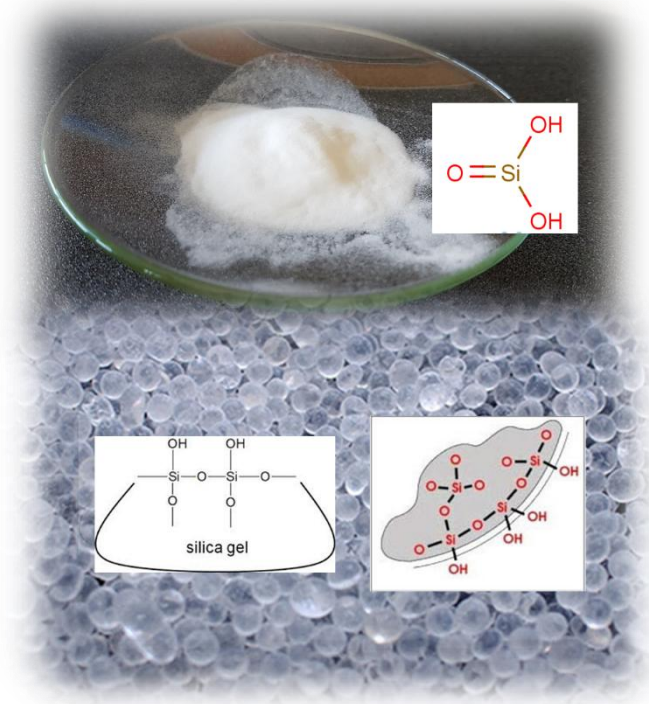
1.8.5. Σίλικά (SiO₂)

Το πυρίτιο, που είναι το πιο άφθονο στοιχείο στη φύση (**Εικόνα 1-21**), είναι αναπόσπαστο μέρος διαφόρων βιομηχανικών εφαρμογών, συμπεριλαμβανομένης της χρήσης του πυρογενούς διοξειδίου του πυριτίου (SiO₂) και του πυριτικού πηκτώματος ως πρόσθετα τροφίμων. Επιπλέον, τα μεσοπορώδη νανοσωματίδια διοξειδίου του πυριτίου χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιοϊατρική λόγω των εξαιρετικών ιδιοτήτων τους, όπως η εκτεταμένη εσωτερική επιφάνεια και ο μεγάλος όγκος πόρων ¹³⁵. Ένα αξιοσημείωτο χαρακτηριστικό των σωματιδίων διοξειδίου του πυριτίου είναι η ικανότητά τους να σταθεροποιούν φορτισμένα φάρμακα ή πεπτίδια, τα οποία μπορούν να φιλοξενηθούν μέσα στους πόρους και να τροποποιηθούν εύκολα ¹³⁶. Η εφαρμογή των μεσοπορωδών σωματιδίων στη βιοϊατρική εκτιμάται ιδιαίτερα λόγω της ικανότητάς τους να ενισχύουν τη διαλυτότητα των φαρμάκων ¹³⁵. Επιπρόσθετα, το πορώδες πυρίτιο (PSi) παρουσιάζει ιδιότητες που το καθιστούν πλεονεκτικό υλικό για ελεγχόμενη απελευθέρωση φαρμάκων και διάφορες φαρμακευτικές εφαρμογές ¹³⁶. Τα σωματίδια της σίλικα, διαθέτουν επίσης την ικανότητα να προσαρμόζονται στο περιβάλλον τους τροποποιώντας ανάλογα τις ιδιότητές τους. Για παράδειγμα, σε υδατικό περιβάλλον, τα σωματίδια αυτά μπορούν να υποστούν μετασχηματισμούς ώστε να γίνουν υδρόφιλα, ικανοποιώντας έτσι απαιτήσεις περιβαλλοντικών συνθηκών¹³⁷.



Εικόνα 1-21. Απεικόνιση του συμβόλου και του ατομικού αριθμού του πυριτίου, καθώς και της μορφής του στη φύση (Οι εικόνες αριστερά και δεξιά πάρθηκαν από το διαδίκτυο).

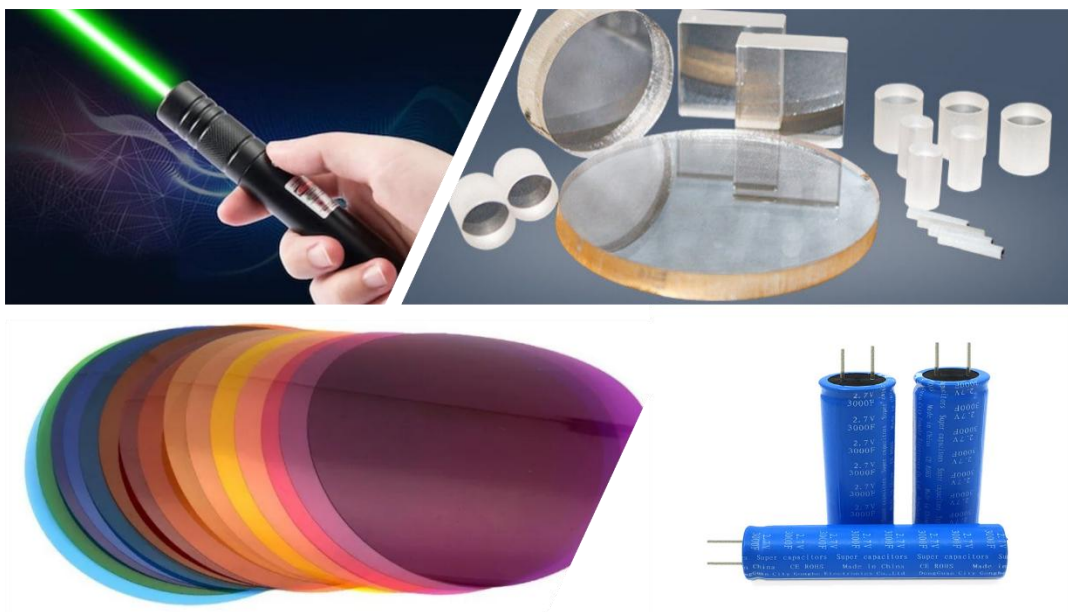
Το διοξείδιο του πυριτίου, που αντιπροσωπεύεται από τον μοριακό τύπο SiO_2 , είναι μια ανόργανη ένωση γνωστή για την πολυπλοκότητα και την αφθονία της (**Εικόνα 1-22**). Είναι παρόν σε φυσικές πηγές, όπως ορυκτά, φυτά, πετρώματα, άμμο, χώμα και ζωντανούς οργανισμούς, και χρησιμοποιείται επίσης σε συνθετικά προϊόντα, όπως συντηρητικά τροφίμων και φαρμακευτικών προϊόντων, καλλυντικά, δομικά υλικά, συσκευασίες και ηλεκτρονικά ⁹⁸. Η σίλικα (SiO_2) είναι ένα πολυμερές του πυριτικού οξέος που χαρακτηρίζεται από ένα τρισδιάστατο δίκτυο διασυνδεδεμένων τετραεδρικών μονάδων SiO_4 ¹³⁸. Το κολλοειδές διοξείδιο του πυριτίου είναι μια πορώδης, κοκκώδης μορφή διοξειδίου του πυριτίου που παράγεται συνθετικά από πυριτικό νάτριο ή σιλίκονη. Οι μοναδικές επιφανειακές του ιδιότητες είναι ζωτικής σημασίας για εφαρμογές που περιλαμβάνουν προσρόφηση και ανταλλαγή ιόντων ¹³⁸. Επιπλέον, ο ομοιοπολικός δεσμός μεταξύ πυριτίου και άνθρακα (Si-C) είναι εξαιρετικά σταθερός και ανθεκτικός στην υδρόλυση ¹³⁹.



Εικόνα 1-22. Η σίλικα (SiO_2) μπορεί να υπάρχει τόσο σε μη κρυσταλλική μορφή (πάνω μέρος) όσο και σε κρυσταλλική μορφή (κάτω μέρος). Η SiO_2 αποτελείται από ένα τρισδιάστατο δίκτυο διασυνδεδεμένων τετραεδρικών μονάδων (Οι εικόνες πάρθηκαν από το διαδίκτυο).

Η σίλικα (SiO_2) μπορεί να υπάρχει τόσο σε κρυσταλλική όσο και σε άμορφη μορφή. Δομικά περιλαμβάνει γέφυρες σιλοξάνης ($\equiv \text{Si}-\text{O}-\text{Si} \equiv$) καθώς και τερματικές σιλανόλες [$\equiv \text{Si}-\text{OH}$ και $= \text{Si}(\text{OH})_2$] (**Εικόνα 1-22**)^{140,141}. Η σίλικα διαθέτει ενεργή επιφάνεια με μεγάλη ειδική επιφάνεια που διευκολύνει τις διαδικασίες προσρόφησης και ανταλλαγής ιόντων. Τυπικά, η ενεργός επιφάνεια της σίλικα διαθέτει μια τερματική ομάδα σιλοξάνης όπως φαίνεται πιο πάνω με ένα άτομο οξυγόνου, επιτρέποντας την απλή τροποποίηση και ενεργοποίηση¹³⁸. Η σίλικα αποτελεί τη μήτρα για τη δημιουργία νέων υβριδικών υλικών, λόγω της εύκολα τροποποιήσιμης επιφάνειάς της, η οποία μπορεί να τροποποιηθεί με διάφορα υλικά και υποκατάστατα. Επιπλέον, προσδίδει βιοσυμβατότητα στο υβριδικό υλικό που προκύπτει¹⁴². Η ενσωμάτωση οργανικών χρωστικών σε κolloειδή σίλικα παράγει υβριδικά υλικά κατάλληλα για ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών, όπως μη γραμμικά οπτικά υλικά, λέιζερ, χημικούς αισθητήρες, φίλτρα χρωμάτων,

ηλιακούς πυκνωτές και άλλα ¹⁴³ (Εικόνα 1-23). Τα υβριδικά υλικά που έχουν ως μήτρα τη σίλικα έχουν επιδείξει εξαιρετικές ιδιότητες, καθιστώντας τα ιδιαίτερα αποτελεσματικά ως φορείς για εφαρμογές βιοϊατρικής απεικόνισης και χορήγησης φαρμάκων ¹⁴².



Εικόνα 1-23. Υλικά που δημιουργούνται από ενσωμάτωση οργανικών χρωστικών στην κολλοειδή σίλικα μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε πολλές εφαρμογές, όπως: λέιζερ, οπτικά, φίλτρα χρωμάτων, καθώς και ηλιακούς πυκνωτές (Οι εικόνες πάρθηκαν από το διαδίκτυο).

1.8.6. Μέθοδοι σύνθεσης υβριδικών υλικών που έχουν ως υλικό υποστήριξης τη σίλικα (SiO₂)

Η επιφάνεια της σίλικα μπορεί να τροποποιηθεί με φυσικές μεθόδους, όπως η θερμική ή υδροθερμική επεξεργασία, οι οποίες μεταβάλλουν τη συγκέντρωση των σιλανολών και των σιλοξανών στην επιφάνειά της. Εναλλακτικά, μπορούν να χρησιμοποιηθούν χημικές τροποποιήσεις για την αλλαγή των χημικών ιδιοτήτων της επιφάνειας της σίλικα ¹³⁸. Η τροποποίηση της επιφάνειας της σίλικα με οργανικά συστατικά ενσωματώνει τις ιδιότητες των οργανικών συστατικών σε ένα ανόργανο πλαίσιο. Η διαδικασία αυτή οδηγεί στη δημιουργία

μοναδικών υβριδικών υλικών που παρουσιάζουν ξεχωριστά και με ιδιαίτερα πλεονεκτήματα χαρακτηριστικά ¹⁴⁴. Η επιφάνεια της μπορεί να τροποποιηθεί χημικά με δύο διαφορετικούς τρόπους. Η μία προσέγγιση περιλαμβάνει την τροποποίηση της επιφάνειας με οργανικές λειτουργικές ομάδες, ενώ η άλλη περιλαμβάνει την τροποποίηση της επιφάνειας με ανόργανες λειτουργικές ομάδες. Στην τελευταία περίπτωση, τα ακινητοποιημένα μόρια στην επιφάνεια είναι συνήθως οργανομεταλλικά σύμπλοκα ή οξείδια μετάλλων ¹³⁸. Τα υβριδικά υλικά μπορούν να συντεθούν με διάφορες μεθόδους, συμπεριλαμβανομένης της συν-συμπύκνωσης, της μετασυνθετικής τροποποίησης μέσω εμβολιασμού και του επιφανειακού πολυμερισμού με τεχνικές «εμβολιασμού προς» και «εμβολιασμού από» ¹⁴².

1.8.6.1. Πολυμερισμός στην επιφάνεια

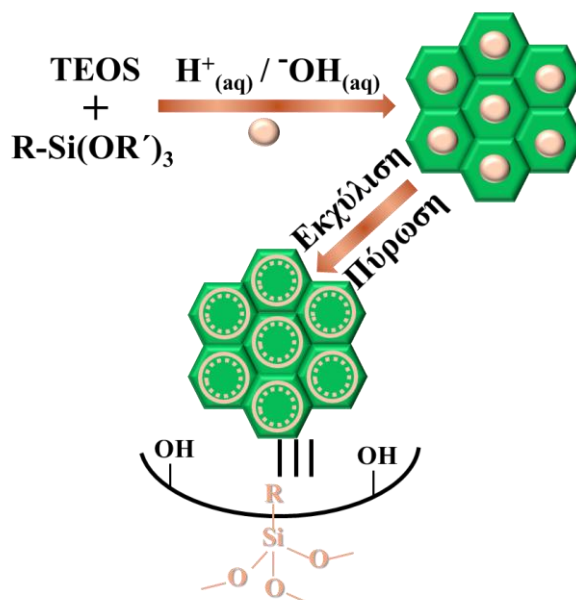
Μία από τις πιο ευρέως αναγνωρισμένες μεθόδους για την ενεργοποίηση της επιφάνειας της σίλικα είναι η τροποποίηση με πολυμερή ¹⁴⁴. Ο πολυμερισμός στην επιφάνεια της σίλικα είναι ζωτικής σημασίας για την ενίσχυση της πυκνότητας των λειτουργικών ομάδων ή για την ενθυλάκωση των επιφανειακών λειτουργικών ομάδων. Η διαδικασία αυτή βελτιώνει την κολλοειδή σταθερότητα των σωματιδίων ¹⁴². Μια εξαιρετικά ευέλικτη τεχνική που χρησιμοποιείται είναι ο ελεγχόμενος πολυμερισμός με ελεύθερες ρίζες, ο οποίος αποσκοπεί στην ακριβή ρύθμιση του μοριακού βάρους, της κατανομής του μοριακού βάρους, της αρχιτεκτονικής του πολυμερούς και των λειτουργικών τροποποιήσεων των τελικών πολυμερικών προϊόντων ¹⁴⁴. Οι μηχανικές και θερμικές ιδιότητες των πολυμερών υπόκεινται σε συνεχή εξέλιξη και βελτίωση, αντανακλώντας συνεχείς βελτιώσεις στην απόδοση των υλικών ¹⁴⁴.

Δύο μέθοδοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την επίτευξη ομοιοπολικού δεσμού μεταξύ των πολυμερών και της επιφάνειας της σίλικα ¹⁴². Η πρώτη μέθοδος που χρησιμοποιείται είναι η τεχνική «εμβολιασμού από», η οποία προσφέρει βελτιωμένο έλεγχο τόσο της διαδικασίας ενεργοποίησης όσο και της πυκνότητας της πολυμερικής επικάλυψης ¹⁴². Η μέθοδος αυτή απαιτεί τη χρήση εκκινητών ακινητοποίησης για την έναρξη και τη διατήρηση του πολυμερισμού *in situ*. Ως αποτέλεσμα, παράγει πολυμερείς επικαλύψεις με υψηλότερη πυκνότητα λόγω των επιδράσεων της στερικής παρεμπόδισης ¹⁴⁴. Μια άλλη μέθοδος είναι η προσέγγιση «εμβολιασμού προς», όπου προσχηματισμένες, ενεργοποιημένες πολυμερικές αλυσίδες εισάγονται σε χημικά δραστικά

υποστρώματα για τη δημιουργία μιας πολυμερικής επικάλυψης. Η μέθοδος αυτή οδηγεί σε πολυμερή με σχετικά χαμηλή πυκνότητα επικάλυψης, η οποία οφείλεται στο στερικό εμπόδιο που αντιμετωπίζουν οι δραστικές ομάδες των προσχηματισμένων πολυμερών ¹⁴².

1.8.6.2. Συν-Συμπύκνωση

Η συν-συμπύκνωση περιλαμβάνει τη χρήση οργανοσιλανίων, όπως το R-τριμεθοξυσιλάνιο ή το R-τριαιθοξυσιλάνιο (TEOS), όπου το «R» αντιπροσωπεύει την οργανική ομάδα που εισάγεται στο διάλυμα TEOS. Η διαδικασία αυτή διευκολύνει την επιτυχή ενσωμάτωση των οργανοσιλανίων στη μήτρα της σίλικα (**Εικόνα 1-24**) ¹⁴⁵.



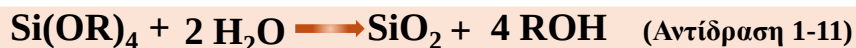
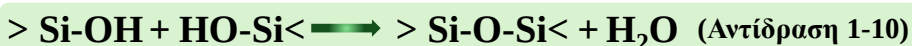
Εικόνα 1-24. Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου συν-συμπύκνωσης με τη χρήση TEOS. Σχήμα τροποποιημένο από Khan, D.; Shaily. Synthesis and Catalytic Applications of Organo-Functionalized MCM-41 Catalyst: A Review. *Appl. Organomet. Chem.* **2023**) ¹⁴⁶.

Η τεχνική αυτή διευκολύνει την άμεση ενεργοποίηση της επιφάνειας της σίλικα κατά τη σύνθεση. Οι οργανικές ομάδες ενσωματώνονται στο δίκτυο πυριτίας μέσω της διαδικασίας sol-gel, επιτρέποντας την άμεση προσκόλληση στην επιφάνεια των σωματιδίων ¹⁴⁶.

1.8.6.3. Μέθοδος πηκτής-γέλης (sol-gel)

Η μέθοδος sol-gel είναι μια από τις πιο ευρέως αναγνωρισμένες και εκτενώς χρησιμοποιούμενες τεχνικές για τη σύνθεση υβριδικών υλικών ¹³⁹. Η διαδικασία sol-gel περιλαμβάνει δύο βασικά στάδια: στο πρώτο στάδιο, τα μοριακά πρόδρομα συστατικά υφίστανται υδρόλυση σε χαμηλές θερμοκρασίες, ακολουθούμενη από ένα δεύτερο στάδιο κατά το οποίο λαμβάνει χώρα συμπύκνωση, με αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός στερεού υλικού ¹⁴³. Η μέθοδος αυτή επιτρέπει την ενσωμάτωση οργανικών μορίων ως υποκαταστατών του συνδετικού υλικού, γεγονός που παρέχει ενισχυμένο χημικό έλεγχο των αντιδράσεων υδρόλυσης και συμπύκνωσης ¹³⁹. Η πρώτη επιτυχής ενσωμάτωση και σταθεροποίηση οργανικών χρωστικών ουσιών με τη μέθοδο sol-gel επιτεύχθηκε από τους Reisfeld *et al*, το 1984. Τα αποτελέσματά τους έδειξαν ότι η ενσωμάτωση οργανικών χρωστικών ουσιών σε υβριδικές μήτρες ανόργανων-οργανικών ουσιών αποδίδει σημαντικά καλύτερες επιδόσεις σε σύγκριση με τη χρήση καθαρών οργανικών χρωστικών ουσιών. Η βελτίωση αυτή αποδίδεται στις βελτιωμένες μηχανικές ιδιότητες των υβριδικών υλικών, όπως η αυξημένη σκληρότητα και η αυξημένη αντοχή στην τριβή ¹⁴³.

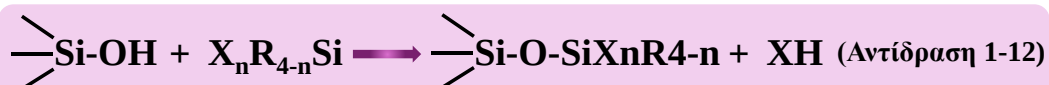
Η χημεία sol-gel βασίζεται κυρίως στην υδρόλυση και τη συμπύκνωση των μετάλλων των αλκοξειδίων, που συμβολίζονται ως $M(OR)_z$, όπου το M^{z+} αντιπροσωπεύει ένα μεταλλικό ιόν και το R μια αλκυλομάδα ¹³⁹. Για το πυρίτιο στην κατάσταση οξείδωσης +4 (Si^{IV}), η υδρόλυση οδηγεί στο σχηματισμό ομάδων M-OH (**Αντίδραση 1-9**). Η επακόλουθη συμπύκνωση δύο ομάδων M-OH οδηγεί στο σχηματισμό οξο-γέφυρας, M-O-M (**Αντίδραση 1-10**). Η συνολική διαδικασία μπορεί να συνοψιστεί στην ακόλουθη γενική αντίδραση (**Αντίδραση 1-11**). Το κύριο πλεονέκτημα της χημείας sol-gel είναι η ικανότητά της να επιτυγχάνει τα επιθυμητά αποτελέσματα υπό ήπιες συνθήκες αντίδρασης ¹³⁹.



Κατά το σχηματισμό ανόργανων-οργανικών υβριδικών υλικών μέσω της μεθόδου sol-gel, οι αντιδράσεις περιλαμβάνουν τον ανόργανο πολυμερισμό πρόδρομων ενώσεων, όπως τα αλκοξείδια μετάλλων. Οι πρόδρομες ενώσεις μπορούν να αναμιχθούν σε μοριακό επίπεδο για να σχηματίσουν νέα υλικά που αποτελούνται από πολλαπλά συστατικά, διατηρώντας παράλληλα συνθήκες χαμηλής θερμοκρασίας ¹³⁹. Οι ιδιότητες των υλικών που συντίθενται με τη διαδικασία sol-gel εξαρτώνται από διάφορες παραμέτρους της αντίδρασης, όπως ο τύπος του διαλύματος, η θερμοκρασία, ο χρόνος αντίδρασης, οι καταλύτες, η συγκέντρωση του μονομερούς και η φύση της διασύνδεσης. Για να εξασφαλιστεί η αναπαραγωγιμότητα και να ληφθούν συνεπή αποτελέσματα, είναι σημαντικό να διατηρούνται ομοιόμορφες συνθήκες αντίδρασης καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας sol-gel ¹⁴⁷.

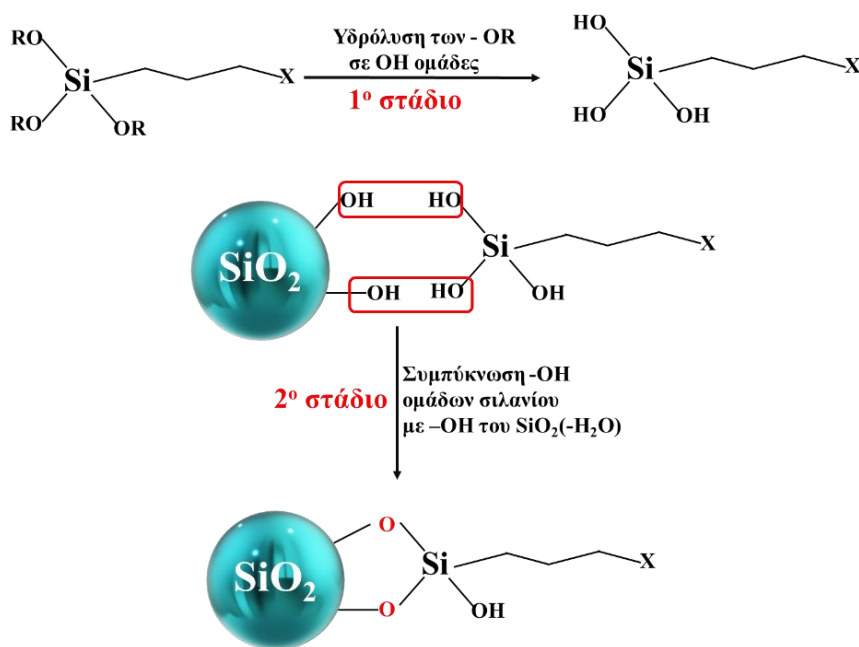
1.8.6.4. Σιλιανοποίηση

Μια από τις πιο αποτελεσματικές και ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους για την ενεργοποίηση διαφόρων επιφανειών είναι η σιλιανοποίηση, η οποία περιλαμβάνει την αντίδραση ομάδων σιλανόλης με κατάλληλα αντιδραστήρια σιλάνιου ¹⁴⁸. Η σιλιανοποίηση διευκολύνει την εισαγωγή νέων λειτουργικών ομάδων μέσω του σχηματισμού ομοιοπολικών δεσμών. Για να τροποποιηθεί η επιφάνεια της σίλικα μέσω της σιλιανοποίησης, οι επιφανειακές υδροξυλομάδες πρέπει να αντιδράσουν με τα εμπορικά διαθέσιμα αντιδραστήρια σύζευξης σιλάνιου. Αυτά τα αντιδραστήρια σύζευξης χρησιμεύουν ως πρόδρομες ουσίες για την επακόλουθη ακινητοποίηση οργανικών μορίων ¹³⁸. Ως πρόδρομες ουσίες συχνά χρησιμοποιούνται ενώσεις που ονομάζονται οργανοσιλάνια και αντιπροσωπεύονται από τον γενικό τύπο $(R_1R_2R_3)SiX_n$, όπου το n κυμαίνεται από 1 έως 3. Τα οργανοσιλάνια είναι μια εξειδικευμένη κατηγορία οργανικών ενώσεων πυριτίου που διαθέτουν υδρολυτικά ενεργές λειτουργικές ομάδες SiX_n με βάση το πυρίτιο ¹⁴⁹. Στον γενικό τύπο για τα οργανοσιλάνια, το X μπορεί να αντικατασταθεί με NH, Cl, OR' (όπου το R' είναι μια αλκυλομάδα) ή άλλες ομάδες, όπως αρυλ, αλκύλιο ή αμινοαλκύλιο (**Αντίδραση 1-12**) ¹⁴⁸.



Τα οργανοσιλάνια μπορούν να αντιδράσουν τόσο με ανόργανα όσο και με οργανικά υποστρώματα, καθώς επίσης και με άλλα οργανοσιλάνια. Οι αντιδράσεις αυτές περιλαμβάνουν

συχνά πολύπλοκες διαδικασίες υδρόλυσης-συμπύκνωσης, με αποτέλεσμα το σχηματισμό ποικίλων ανόργανων-οργανικών υβριδικών υλικών. Ο υποκαταστάτης X στα οργανοσιλάνια είναι συνήθως υδρολύσιμος, επιτρέποντας στην τρισθενή λειτουργική ομάδα SiX_3 να μετατραπεί σε ενδιάμεσα προϊόντα σιλανόλης όπως $\text{RSiX}_2\text{-OH}$, RSiX(OH)_2 ή RSiX(OH)_3 κατά την αντίδραση με νερό (**Εικόνα 1-25**)¹⁴⁹. Κατά συνέπεια, σχηματίζονται 1 έως 3 δεσμοί Si-O-Si στην επιφάνεια της σίλικα μέσω αντίδρασης συμπύκνωσης με τις επιφανειακές σιλανολικές ομάδες¹⁴². Ο δεσμός Si-O-Si που σχηματίζεται παρουσιάζει διπλά λειτουργικά χαρακτηριστικά. Παρέχει σταθερή πρόσδεση λειτουργικών ομάδων στη μήτρα, ενώ παράλληλα επιτρέπει περαιτέρω τροποποιήσεις και ενισχύει τη χημική σταθερότητα¹³⁸.



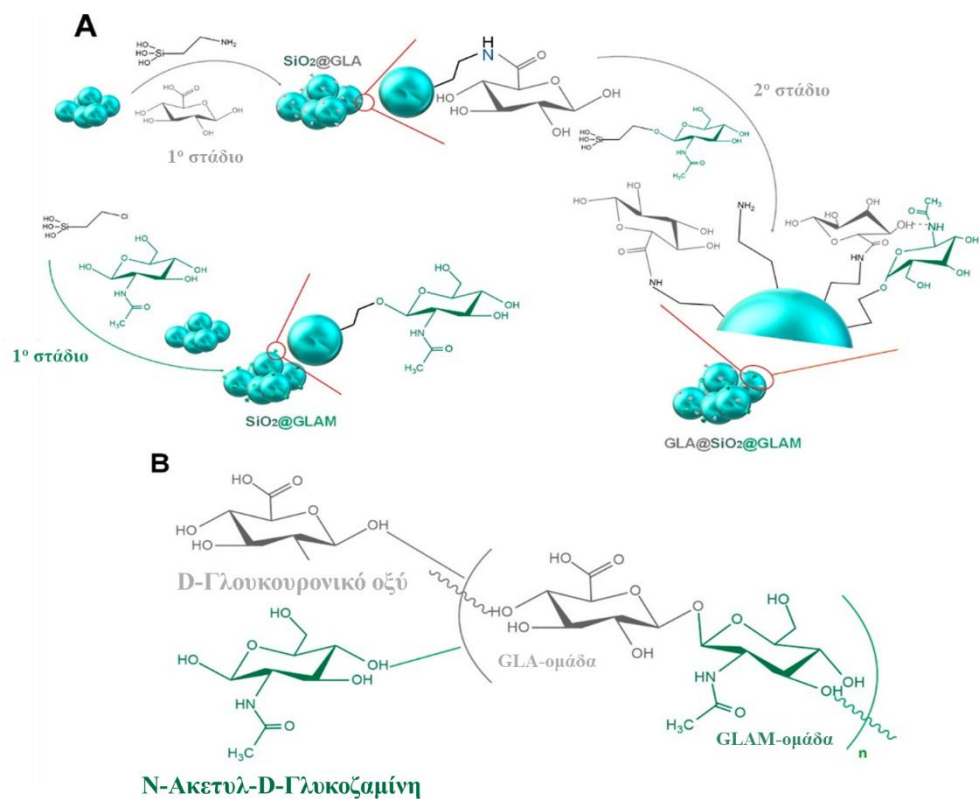
Εικόνα 1-25. Απεικονίζονται οι διαδικασίες τροποποίησης της επιφάνειας της σίλικα με τη χρήση οργανοσιλανίων. Στο πλαίσιο αυτό, ο υποκαταστάτης X μπορεί να αντιπροσωπεύει είτε NH_2 είτε Cl , ανάλογα με το συγκεκριμένο χρησιμοποιούμενο σιλάνιο και R ανθρακικές αλυσίδες.

1.8.7. Αντιοξειδωτικά υλικά που έχουν ως υλικό υποστήριξης τη σίλικα (SiO_2)

Η σίλικα είναι κατάλληλο υλικό για τη δημιουργία γαλακτωμάτων χρωστικών λόγω της ευκολίας τροποποίησης της επιφάνειάς της. Ο συνδυασμός χρωστικών ουσιών με ανόργανες μήτρες ή φυσικές πολυφαινόλες οδηγεί σε υβριδικά υλικά που ενσωματώνουν τις ιδιότητες των

μονομερών που τα αποτελούν. Αυτά τα υβριδικά αντιοξειδωτικά συστήματα επιδεικνύουν pH-εξαρτώμενη δράση απορρόφησης έναντι του μονήρους οξυγόνου και ενισχύουν την οξειδωτική σταθερότητα σε καλλυντικά γαλακτώματα χρωστικών ¹¹¹. Στο πλαίσιο αυτό, δημιουργήθηκε ένα διλειτουργικό χρωστικό-νανοαντιοξειδωτικό με βάση το καρμινικό οξύ που συνδέεται ομοιοπολικά με την αμινο-ακινητοποιημένη νανοδομή τύπου πυρήνα-κελύφους πυριτίας (πυκνός πυρήνας πυριτίας με μεσοπορώδες κέλυφος πυριτίας) ²¹.

Κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της μεταπτυχιακής μου διατριβής, αναπτύξαμε μια νέα σειρά υβριδικών αντιοξειδωτικών υλικών (**Εικόνα 1-26**) που αποτελούνται από τα μονομερή του υαλουρονικού οξέος (HyA), συγκεκριμένα το D-Γλυκουρονικό οξύ (GLA) και την N-Ακετυλ-D-Γλυκοζαμίνη (GLAM), ομοιοπολικά εμβολιασμένα σε νανοσωματίδια SiO₂. Τα υλικά που προέκυψαν ονομάστηκαν SiO₂@GLA, SiO₂@GLAM και GLA@SiO₂@GLAM, με μοριακή αναλογία [GLA:GLAM] ίσο με [2:1] και [3:1] ⁸⁷ (**Πίνακας 1-3**). Η ικανότητα εξουδετέρωσης των ριζών (RSC) αξιολογήθηκε με την παρακολούθηση της διάσπασης των ριζών DPPH με τη χρήση φασματοσκοπίας UV-Vis. Τα υβριδικά αντιοξειδωτικά επέδειξαν σημαντική δραστηριότητα Μεταφοράς Ατόμων Υδρογόνου (HAT) έναντι των ριζών DPPH, ενώ τα αντίστοιχα μη ακινητοποιημένα μονομερή του υαλουρονικού οξέος (HyA) παρουσίασαν μηδενική δραστηριότητα ⁸⁷. Το διπλά εμβολιασμένο υλικό {GLA@SiO₂@GLAM} με μοριακή αναλογία [GLA:GLAM] [2:1] εμφάνισε την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση κατά των ριζών DPPH, μέσω του μηχανισμού HAT ⁸⁷. Ακολουθεί το {GLA@SiO₂@GLAM} με μοριακή αναλογία [GLA:GLAM] [3:1], το οποίο παρουσίασε $n_{fast} = 1.1$ και $E_a = 46.6 \pm 1 \text{ kJ/mol}$ ⁸⁷, έναντι των $n_{fast} = 1.1$, $E_a = 42.2 \pm 1 \text{ kJ/mol}$ του υβριδικού υλικού {GLA@SiO₂@GLAM} με μοριακή αναλογία [GLA:GLAM] [2:1] λόγω δεσμών-H μεταξύ της μήτρας SiO₂, του GLA και του GLAM που μειώνουν το E_a . ⁸⁷



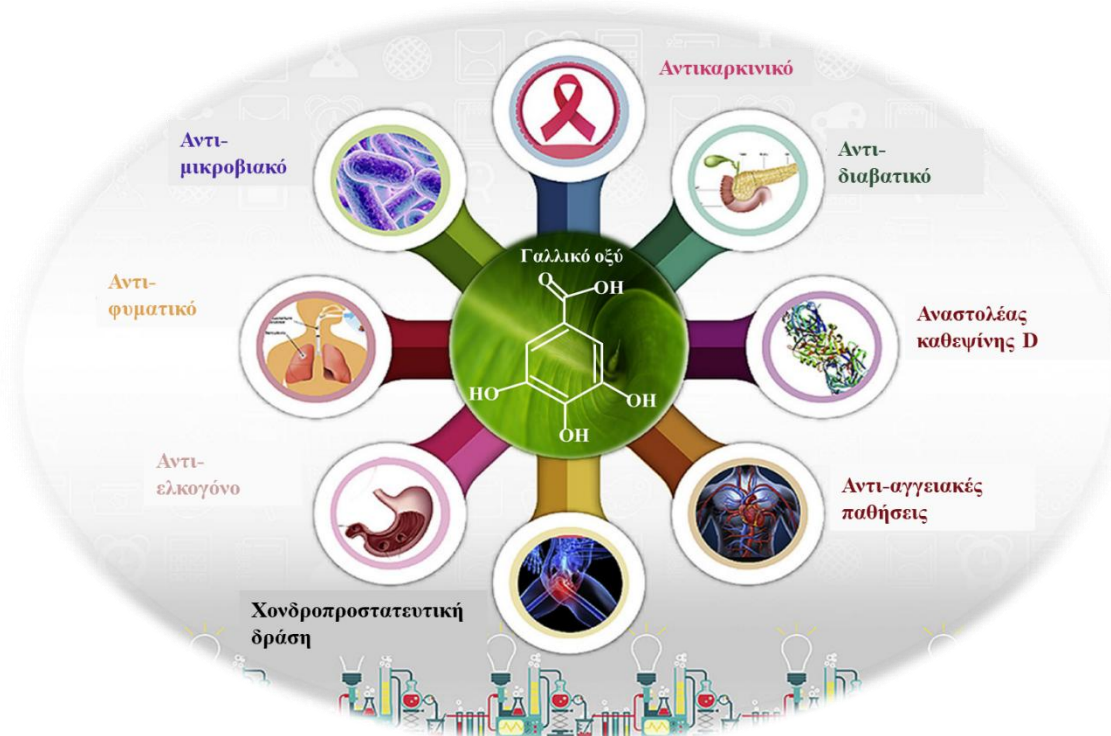
Εικόνα 1-26. Σχηματική απεικόνιση (A) της σύνθεσης των υβριδικών νανοαντιοξειδωτικών μέσω των ομοιοπολικά συνδεδεμένων μονομερών του υαλουρονικού οξέος στην επιφάνεια της σίλικα και (B) των δομικών μονάδων του υαλουρονικού οξέος, δηλαδή του D-γλουκουρονικού οξέος και της N-ακετυλ-D-γλυκοζαμίνης (Σχήμα τροποποιημένο από Theofanous, A.; Sarli, I.; Fragou, F.; Bletsas, E.; Deligiannakis, Y.; Louloudi, M. Antioxidant Hydrogen-Atom-Transfer to DPPH Radicals by Hybrids of {Hyaluronic-Acid Components}@SiO₂. *Langmuir* **2022**)⁸⁷.

Μια άλλη κατηγορία υβριδικών υλικών με αντιοξειδωτικές ικανότητες με βάση τη σίλικα είναι τα υβριδικά υλικά που προκύπτουν με ομοιοπολικό εμβολιασμό ενός πολυφαινολικού πολυμερούς (Humic Acid Like Polycondensate (HALP)) (Χουμικού οξέος) σε νανοσωματίδια SiO₂ διαφορετικών ειδικών επιφανειών (SSA)²³. Η αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης πραγματοποιήθηκε μέσω της ικανότητας των υβριδικών υλικών να εξουδετερώνουν τις ρίζες DPPH μέσω του μηχανισμού HAT. Αποδείχθηκε ότι τα επιφανειακά εμβολιασμένα HALP αποδίδουν 300% καλύτερα HAT από τα μη εμβολιασμένα HALP σε διάλυμα²³. Επιπλέον, αποδείχθηκε ότι η απόδοση του HAT μπορεί να βελτιστοποιηθεί ελέγχοντας τον τύπο σωματιδίων και τη φόρτωση εμβολιασμού (το ποσοστό του οργανικού φορτίου)²³.

Η μορίνη (2',3,4',5,7-πενταϋδροξυφλαβόνη), μια φαινολική ένωση άφθονη στα λαχανικά, ακινητοποιήθηκε σε νανοσωματίδια μεσοπορώδους πυριτίας (MSN) για να σχηματιστεί το υβριδικό νανοαντιοξειδωτικό υλικό MSN-morin ³¹. Η αντιοξειδωτική δράση αυτού του υβριδικού υλικού αξιολογήθηκε μέσω φασματοσκοπίας Παραμαγνητικού Συντονισμού Ηλεκτρονίων (EPR) για τη μέτρηση της ικανότητας εξουδετέρωσης ριζών υδροξυλίου (HO•) σε ένα σύστημα όπου οι εν λόγω ρίζες δημιουργήθηκαν *in situ* μέσω της υπεριώδους φωτόλυσης υπεροξειδίου του υδρογόνου 10% (v/v) ³¹. Η αντιοξειδωτική δραστηριότητα του υβριδικού νανοαντιοξειδωτικού AMSNPs-MOR φάνηκε ενισχυμένη κατά 57% σε σύγκριση με το μη ακινητοποιημένο μόριο morin ³¹ (Πίνακας 1-3).

1.8.8. Υβριδικά υλικά με χρήση γαλλικού οξέος (GA) ως αντιοξειδωτικής μονάδας

Το γαλλικό οξύ, ένα πολύ γνωστό αντιοξειδωτικό, είναι μια φυσική φαινολική ένωση που βρίσκεται στα φυτά (Εικόνα 1-27). Έχει αποδειχθεί ότι είναι ένα εξαιρετικά αποτελεσματικό αντιοξειδωτικό τόσο σε γαλακτώματα όσο και σε λιπιδικά συστήματα ¹⁵⁰. Το γαλλικό οξύ είναι μια φαινολική ένωση που χρησιμοποιείται στα καλλυντικά, στα τρόφιμα, αλλά και στα υλικά συσκευασίας για την αναστολή της υπεροξειδωσίας των λιπιδίων και των επακόλουθων αλλοιώσεων. Αυτή η εφαρμογή βοηθά στην πρόληψη της οξειδωτικής αποικοδόμησης των λιπιδίων, διατηρώντας έτσι την ποιότητα και τη σταθερότητα των προϊόντων. Επιδεικνύει αποτελεσματικότητα συγκρίσιμη με το ανάλογο της τοκοφερόλης Trolox και ξεπερνά πολλά υδατοδιαλυτά αντιοξειδωτικά, όπως το ασκορβικό οξύ, ως προς την αποτελεσματικότητά του ¹⁵⁰. Το γαλλικό οξύ (3,4,5-τριυδροξυβενζοϊκό οξύ) και τα παράγωγά του ταξινομούνται ως φυσικές αντιοξειδωτικές φαινόλες. Αυτές οι ενώσεις αναγνωρίζονται για τις πλεονεκτικές τους ιδιότητες και ονομάζονται φυσικά αντιοξειδωτικά λόγω της παρουσίας τους στο φυτικό βασίλειο καθώς και του ρόλου τους ως πολυφαινολικοί μεταβολίτες ¹⁵¹.



Εικόνα 1-27. Το γαλλικό οξύ, είναι το πιο διαδεδομένο φυσικό αντιοξειδωτικό παγκοσμίως, το οποίο παρέχει πάρα πολλές ευεργετικές ιδιότητες (Σχήμα το οποίο τροποποιήθηκε από European Journal of Medical Chemistry) ¹⁵².

Λαμβάνοντας υπόψη τα προαναφερθέντα χαρακτηριστικά, το γαλλικό οξύ αναδεικνύεται ως ένας ευνοϊκός υποψήφιος για τη σύνθεση καινοτόμων υβριδικών υλικών που προορίζονται για αντιοξειδωτικές εφαρμογές. Οι Peng *et al*, συνέθεσαν μια σειρά υβριδικών υλικών συνδυάζοντας γαλλικό οξύ με βενζυλιδεϋδραζίνη και αξιολόγησαν την αποτελεσματικότητά τους στην αναστολή της τυροσινάσης. Ορισμένα υβριδικά υλικά παρουσίασαν σημαντική δράση εξουδετέρωσης των ριζών DPPH ¹⁵³. Μια πολυλειτουργική νανοεπικάλυψη, αποτελούμενη από νανοσωματίδια ZnO, χιτοζάνη και γαλλικό οξύ, παρουσίασε αξιοσημείωτη αναστολή των ριζών DPPH, φτάνοντας έως και 95% αντιοξειδωτικής δράσης ¹⁵⁴. Οι Khan *et al*, χρησιμοποίησαν μια ηχοχημική προσέγγιση για την κατασκευή πολυακτινοποιημένων φακών επαφής, οι οποίοι ήταν επικαλυμμένοι με γαλλικό οξύ (GA), με νανοσωματίδια οξειδίου του ψευδαργύρου επικαλυμμένα με φυτομόρια (ZN) και με νανοσωματίδια οξειδίου του ψευδαργύρου επικαλυμμένα με φυτομόρια σε συνδυασμό με γαλλικό οξύ και τομπραμυκίνη (ZGT). Ειδικότερα, οι φακοί επικαλυμμένοι τόσο με ZN όσο και με GA επέδειξαν σημαντική αντιοξειδωτική δράση ¹⁵⁵. Συζητήθηκαν ερευνητικά

ευρήματα σχετικά με την ελεγχόμενη σύνθεση μαγνητίτη με επακριβώς προσαρμοσμένα μεγέθη και την επακόλουθη ακινητοποίηση της επιφάνειας με τη χρήση φυσικού γαλλικού οξέος (GA). Η επιφανειακή τροποποίηση επιτεύχθηκε μέσω τεχνικών τόσο *in situ* όσο και μετά τη σύνθεση. Η αντιοξειδωτική δράση του υλικού που προέκυψε αξιολογήθηκε με τη μέθοδο DPPH ²⁴.

Οι Sotiriou *et al*, συνέθεσαν ένα πλασμονικό υβριδικό υλικό (παρουσίασε πλασμονικό αποτέλεσμα σε μήκη κύματος κοντά στο IR) μέσω της ακινητοποίησης του γαλλικού οξέος σε πλασμονικά NP Ag με εξωτερική επίστρωση πυριτίου ¹³². Η μέθοδος DPPH χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης αυτών των νανοσωματιδίων. Οι κινητικές μελέτες δείχνουν μια ταχεία φάση (n_{fast}) στην αρχή που καθορίζει την αντιοξειδωτική ικανότητα προς τις ρίζες DPPH ¹³². Κατά τη διάρκεια της γρήγορης φάσης (n_{fast}), το $SiO_2@Ag@GA$ εξουδετερώνει τις ρίζες DPPH λόγω των αντιδράσεων 2 ηλεκτρονίων/ 2 πρωτονίων ανά μόριο GA. Μετά το μόσχευμα, η ενθαλπία διάστασης δεσμού του δεσμού GA-OH μειώνεται κατά 2 kcal/mol ¹³² (Πίνακας 1-3).

Επιπρόσθετα, σε προηγούμενη δουλειά του εργαστηρίου μας, εμβολιάστηκαν με επιτυχία ομοιοπολικά μόρια γαλλικού οξέος (GA) στην επιφάνεια της νανο- SiO_2 ¹⁰⁶. Η αξιολόγηση των νανοϋβριδικών υλικών SiO_2 -GA πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας δύο φασματοσκοπικές μεθόδους: Παραμαγνητικό Συντονισμό Ηλεκτρονίων (EPR) για την άμεση ανίχνευση των σχηματισμένων ριζών και τη φασματοσκοπία (UV-Vis) για την αξιολόγηση της εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH ¹⁰⁶. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα αντιοξειδωτικά SiO_2 -GA εξουδετερώνουν τις ρίζες DPPH μέσω του μηχανισμού **Μεταφοράς Ατόμου Υδρογόνου (HAT)**. Η κινητική ανάλυση αποκάλυψε ότι η αντίδραση μεταξύ SiO_2 -GA και της ρίζας DPPH λαμβάνει χώρα σε πολλαπλές φάσεις: μια γρήγορη φάση [n_{fast} ($t_{1/2} < 1$ λεπτό)] που αντιστοιχεί στον μηχανισμό HAT και μια πιο αργή φάση (n_{slow}) όπου λαμβάνουν χώρα αλληλεπιδράσεις ριζών-ριζών ¹⁰⁶. Τα νανοσωματίδια SiO_2 -GA παρατηρήθηκε ότι εξουδετερώνουν 4.1 (± 0.2) μM ριζών DPPH, που αντιστοιχεί σε $n_{fast} = 2.1 \pm 0.2$ ¹⁰⁶ (Πίνακας 1-3).

Πιο πάνω αναφέρθηκαν υβριδικά υλικά του γαλλικού οξέος τα οποία αξιολογήθηκαν ως προς την ικανότητα εξουδετέρωσης ριζών DPPH. Όμως οι Pasanphan *et al* συνέθεσαν ένα καινοτόμο αντιοξειδωτικό που προκύπτει από τη σύζευξη του βιοπολυμερούς χιτοζάνης με γαλλικό οξύ και διερεύνησαν την ικανότητα εξουδετέρωσης ριζών υδροξυλίου του υλικού χιτοζάνη-GA, ειδικά όταν παράγονται κατά την αντίδραση Fenton. Η αποτελεσματικότητα

απόσβεσης των ριζών υδροξυλίου ($\bullet\text{OH}$) παρουσιάζει μια κορυφαία αντιοξειδωτική ικανότητα στο 90% σε συγκέντρωση γαλλικού οξέος (GA) 0.19 mg/ml (1000 μM), παρουσιάζοντας μια επακόλουθη μείωση καθώς η συγκέντρωση GA ξεπερνά αυτό το όριο ²⁴. Για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης του υβριδικού υλικού χρησιμοποιήθηκε η φασματοσκοπία EPR με την μέθοδο παγίδευσης σπιν. Οι Ren *et al* συνέθεσαν χιτοζάνη με γαλλικό οξύ και χιτοζάνη με καφεϊκό οξύ και τα υλικά αυτά αξιολογήθηκαν συστηματικά ως προς την αντιοξειδωτική τους ικανότητα όσον αφορά τις ρίζες υδροξυλίου. Η αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης πραγματοποιήθηκε με τη χρήση φασματοσκοπίας UV-Vis. Οι ρίζες υδροξυλίου δημιουργήθηκαν μέσω EDTA- Fe^{2+} , σαφρανίνης O και H_2O_2 σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου με pH 7.4 ¹⁵⁶.

1.8.9. Υβριδικά υλικά με χρήση του υαλουρονικού οξέος ως αντιοξειδωτικού

Το υαλουρονικό οξύ (HA), που είναι ένας φυσικός πολυσακχαρίτης πλούσιος σε χημικά τροποποιήσιμες ομάδες, διαθέτει πληθώρα βιολογικών δραστηριοτήτων (Εικόνα 1-28) ¹⁵⁷.



Εικόνα 1-28. Το υαλουρονικό οξύ είναι ένας από τους πιο διαδεδομένους φυσικούς πολυσακχαρίτες που εμφανίζει πολύ καλή αντιοξειδωτική ικανότητα και χρησιμοποιείται ευρέως στα καλλυντικά (Εικόνα τροποποιημένη από το διαδίκτυο).

Τα κύτταρα του ανθρώπινου σώματος παρουσιάζουν την ικανότητα να συνθέτουν υαλουρονικό οξύ (HyA) κατά τη διάρκεια συγκεκριμένων σταδίων του κυτταρικού τους κύκλου, υποδεικνύοντας έτσι τη συμμετοχή του σε βασικές βιολογικές διεργασίες ¹⁵⁸. Το υαλουρονικό οξύ ταξινομείται στην κατηγορία των αντιοξειδωτικών. Κατά συνέπεια, η αντιοξειδωτική του δράση μπορεί να διερευνηθεί μέσω διαφόρων πειραματικών προσεγγίσεων.

Η αντιοξειδωτική δράση του πολυσακχαρίτη υαλουρονικού οξέος και των μονομερών που το αποτελούν, των μονοσακχαριτών D-Γλυκουρονικό οξύ και N-Ακετυλο-D-Γλυκοζαμίνη, διερευνήθηκε με τη χρήση των μεθόδων DPPH και Fenton (OH). Πολυάριθμες μελέτες έχουν διεξαχθεί για υβριδικά υλικά υαλουρονικού οξέος με τη μορφή υδρογελών. Η αντιοξειδωτική δράση των υβριδικών υδρογελών υαλουρονικού οξέος μελετήθηκε με τη μέθοδο DPPH με τη χρήση φασματοφωτομέτρου UV-Vis. Για παράδειγμα, το DHP-A ενσωματώθηκε σε υδρογέλη υαλουρονικού οξέος (HA) για την κατασκευή σύνθετων ικριωμάτων (υδρογέλη DHP-HA), από τους Wenhui Pei *et al* ¹⁵⁹. Οι Xu *et al*, συνέθεσαν μια υδρογέλη παραγώγου υαλουρονικού οξέος που ανταποκρίνεται στη γλυκόζη (HAMA-PBA) τροποποιώντας το μεθακρυλικό υαλουρονικό οξύ (HAMA) με φαινυλοβορονικό οξύ (PBA) ¹⁵⁷. Επίσης, οι Chandika *et al*, συνέδεσαν το σιναπικό οξύ (SA) με χιτοολιγοσακχαρίτες (COS), για να φτιάξουν το COS-SA, και στη συνέχεια μέσω μεθακρυλίωσης συντέθηκε φωτοδιασταυρούμενο υαλουρονικό οξύ (HAMA) ¹⁶⁰. Από την άλλη πλευρά, οι Jongprasitkul *et al* ακινητοποίησαν το υαλουρονικό οξύ σε γαλλικό οξύ και σε μεθακρυλικό και συνέθεσαν το υλικό HAGA-HAMA ¹⁶¹. Ένα άλλο παράδειγμα υδρογέλης στη βιβλιογραφία είναι η υδρογέλη ζελατίνης και υαλουρονικού οξέος, η οποία ενισχύεται με την ενσωμάτωση σωματιδίων AuNPs@LNFs ¹⁶². Οι Yu *et al* συνέθεσαν μια υβριδική υδρογέλη με βάση το υαλουρονικό οξύ και την πολυδοπαμίνη ¹⁶³.

Στη μελέτη των Ionescu *et al*, το μέλι Manuka, η ινσουλίνη, η L-αργινίνη και το έγχυμα *Calendula officinalis*, ενσωματώθηκαν σε μεμβράνη νανοϊνών με βάση το υαλουρονικό οξύ/πολυ(οξείδιο του αιθυλενίου) με ηλεκτροσπορά. Η ικανότητα των υλικών να παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο DPPH και τη χρήση φασματοφωτόμετρου UV-Vis ¹⁶⁴. Οι Katiyar *et al*, συνέθεσαν νέες αιμοσυμβατές κατασκευές που αποτελούνται από χιτοζάνη, ζελατίνη και υαλουρονικό οξύ εμποτισμένο με υβρίδια οξειδίου του γραφενίου-σιλιμαρίνης (CGH-SGO) και αξιολόγησαν την αντιοξειδωτική τους δράση με τη μέθοδο DPPH και τη φασματοφωτομετρία UV-Vis ¹⁶⁵. Οι Li *et al*, συνέθεσαν το υλικό λακτοφερρίνη (LF)-

υαλουρονικό οξύ (HA) (LF-HA) και αξιολόγησαν την αντιοξειδωτική του δράση μέσω της μεθόδου DPPH σε συνδυασμό με τη φασματοσκοπία UV-Vis ¹⁶⁶. Επίσης, κατά τη διάρκεια εκπόνησης της μεταπτυχιακής μου διατριβής συντέθηκαν τα υβριδικά υλικά SiO₂@GLA, SiO₂@GLAM και το διπλά ακινητοποιημένο υβριδικό υλικό GLA@SiO₂@GLAM, τα οποία αξιολογήθηκαν ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση μέσω της μεθόδου DPPH, όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω.

Όλα τα παραπάνω υβριδικά υλικά του υαλουρονικού οξέος αξιολογήθηκαν ως προς την ικανότητα εξουδετέρωσης των **ριζών DPPH** μέσω τη **φασματοσκοπίας UV-Vis**.

Οι Zhang *et al*, δημιούργησαν προηγμένες υδρογέλες (HA-DA/AD) με βελτιωμένες αντιοξειδωτικές ιδιότητες, χρησιμοποιώντας παράγωγα αργινίνης (AD), ενσωματωμένα σε υαλουρονικό οξύ με ντοπαμίνη (HA-DA). Αξιολόγησαν την αντιοξειδωτική αποτελεσματικότητα των υβριδικών υλικών χρησιμοποιώντας τόσο τη μέθοδο DPPH όσο και τη δοκιμασία ριζών υδροξυλίου ([•]OH) εντός του συστήματος Fenton ¹⁶⁷. Επιπλέον, οι Chang *et al* συνέθεσαν ένα υβριδικό υλικό που αποτελείται από υαλουρονικό οξύ, τυραμίνη και νανοσωματίδια αργύρου. Μελετήθηκε η ικανότητα απορρόφησης των ριζών DPPH και [•]OH (αντίδραση Fenton). Χρησιμοποιήθηκε η φασματοσκοπία UV-Vis ¹⁶⁸. Σε αυτά τα δύο παραδείγματα μελετήθηκε η αντιοξειδωτική δράση των υβριδικών υλικών του υαλουρονικού οξέος τόσο ως προς τις **ρίζες DPPH** όσο και για τις **ρίζες υδροξυλίου** με τη χρήση **φασματοσκοπίας UV-Vis**.

Στην υπάρχουσα βιβλιογραφία, υπάρχει περιορισμένος αριθμός μελετών που εξετάζουν τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες του υαλουρονικού οξέος με τη μέθοδο της ρίζας υδροξυλίου ([•]OH) και χρησιμοποιώντας φασματοσκοπία EPR. Οι Praga *et al*, διεξήγαγαν μια μελέτη σχετικά με την αντιοξειδωτική δράση του υαλουρονικού οξέος έναντι των ριζών υδροξυλίου (OH). Οι ρίζες [•]OH δημιουργήθηκαν μέσω της αντίδρασης Fenton και η δραστηριότητά τους αναλύθηκε με τη χρήση **φασματοσκοπίας EPR** ¹⁶⁹.

1.8.10. Υβριδικά υλικά που έχουν ως υλικά υποστήριξης νανοσωματίδια αργύρου και χρυσού (Ag, Au NPs).

Οι Medhe *et al*, έδειξαν ότι η 3,6-διυδροξυφλαβόνη που ενσωματώνεται σε νανοσωματίδια χρυσού επιδεικνύει ενισχυμένες αντιοξειδωτικές ιδιότητες ως προς τις ρίζες $\bullet\text{OH}$ σε σύγκριση με τα μη τροποποιημένα νανοσωματίδια χρυσού ⁹⁹. Οι ρίζες υδροξυλίου, δημιουργήθηκαν μέσω της αντίδρασης Fenton παρουσία αναγωγικών μετάλλων μετάπτωσης, όπως ο Fe^{2+} και το H_2O_2 ⁹⁹. Επιπρόσθετα νανοϋλικά τροποποιημένα με νανοσωματίδια χρυσού (AuNP) από διοξείδιο του δημητρίου (CeO_2) με τρεις διαφορετικές μορφολογίες συντέθηκαν από τους Fa *et al* ⁹². Τα προαναφερθέντα υλικά αξιολογήθηκαν ως προς την αποτελεσματικότητά τους στην εξουδετέρωση των ριζών υδροξυλίου ($\bullet\text{OH}$), οι οποίες παράγονται μέσω της αντίδρασης Fenton. Για την ανάλυση όλων των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε φασματοσκοπία UV-Vis.

Μια άλλη ομάδα νανοσωματιδίων, τα διμεταλλικά νανοσωματίδια Ag/Cu και Cu/Zn συντέθηκαν μέσω μιας πράσινης προσέγγισης με τη χρήση toddy ως αναγωγικού παράγοντα, από τους Merugu *et al*. Η διερεύνηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας περιλάμβανε διάφορες μεθόδους, όπως την εξουδετέρωση των ριζών υδροξυλίου ($\bullet\text{OH}$). Για την επιδίωξη αυτού του στόχου χρησιμοποιήθηκε η φασματοφωτομετρία υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC). Σε αυξημένες συγκεντρώσεις, τα νανοσωματίδια Ag/Cu παρουσιάζουν ανώτερη αντιοξειδωτική δράση σε σύγκριση με τα νανοσωματίδια Cu/Zn ¹⁷⁰. Επιπλέον, οι Sharma *et al*, συνέθεσαν διμεταλλικά νανοσωματίδια Au/Ag (BMNPs) μέσω μιας διαδικασίας ενός σταδίου. Η αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας αποκάλυψε ότι τα διμεταλλικά νανοσωματίδια χρυσού/αργύρου (Au/Ag BMNPs) παρουσίασαν ανώτερες αντιοξειδωτικές και καταλυτικές ιδιότητες σε σύγκριση με τα μονομεταλλικά νανοσωματίδια (MMNPs). Η αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης των υλικών πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο δέσμευσης των ριζών υδροξυλίου ($\bullet\text{OH}$). Η βασική αρχή αυτής της μεθόδου περιλαμβάνει το σχηματισμό μιας χρωμοφόρου ένωσης που προκύπτει από την οξειδωτική αποικοδόμηση της 2-δεοξυριβόζης με τη μεσολάβηση ριζών υδροξυλίου ¹⁷¹.

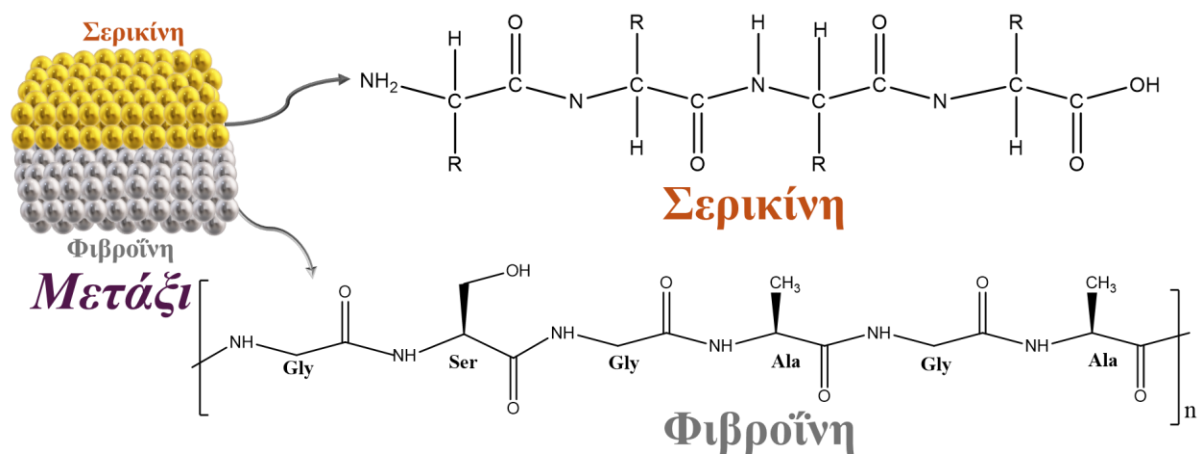
1.8.11. Μετάξι (Silk fiber)

Το μετάξι, είναι ένα αρχαίο βιοϋλικό, το οποίο κερδίζει ολοένα και μεγαλύτερη αναγνώριση για τις αναδυόμενες εφαρμογές του στον τομέα της βιοϊατρικής μηχανικής. Το μετάξι είναι μια βιοπολυμερική πρωτεΐνη αποτελούμενη από ίνες η οποία μπορεί να δημιουργηθεί από την αράχνη και τον μεταξοσκώληκα ¹⁷². Ο άγριος *Antheraea pernyi* και ο *Bombyx mori* είναι οι δύο κυριότεροι τύποι μεταξοσκώληκα οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την παραγωγή καλλιεργούμενου μεταξιού. Οι συγκεκριμένοι τύποι μεταξοσκώληκα έχουν μεγάλο μέγεθος κουκουλιών ¹⁷³. Τα κουκούλια του *Bombyx mori* είναι φυσικά μεταξωτά υλικά που χαρακτηρίζονται από μοναδική δομική σύνθεση και πολυλειτουργικές ιδιότητες ¹⁷⁴. Το μετάξι χαρακτηρίζεται ως η "βασίλισσα των υφασμάτων", λόγω των εκπληκτικών ιδιοτήτων του, όπως βιοσυμβατότητα και στιλπνότητα, καθώς και αντοχή σε εκφυλισμό (**Εικόνα 1-29**). Λόγω των πιο πάνω ιδιοτήτων του το μετάξι βρίσκει εφαρμογές ως βιοϋλικό στα καλλυντικά και την ιατρική, καθώς και στην κλωστοϋφαντουργία. Οι εξαιρετικές ιδιότητες του μεταξιού προσδίδονται από τις ινώδεις πρωτεΐνες ^{173,175,176}.



Εικόνα 1-29. Αρχικά ο μεταξοσκώληκας δημιουργεί το κουκούλι του. Έπειτα από το κουκούλι του μεταξοσκώληκα δημιουργείται το μετάξι το οποίο στη συνέχεια μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην παραγωγή μεταξωτών υφασμάτων (Οι εικόνες τροποποιήθηκαν από το διαδίκτυο).

Οι Tristan *et al* ανέδειξαν την εξαιρετική αντοχή των ινών μεταξιού τόσο με υπολογιστικά όσο και με φυσικά πειράματα ¹⁷⁵. Το μετάξι απαρτίζεται από δύο κύρια συστατικά, τη σερικίνη (sericin) και τη φιβροΐνη (ινώδες) τα οποία ενώνονται μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς. Τα αμινοξέα γλυκίνη, σερίνη και ασπαρτικό οξύ απαρτίζουν την σερικίνη που αποτελεί το 25% του μεταξιού. Η σερικίνη είναι υδατοδιαλυτή και θεωρείται ως η κόλλα που συνδέει τις ίνες μεταξύ τους ¹⁷⁷ και συμβάλει στη δομική ακεραιότητα και τη διατήρηση του σχήματος του κουκουλιού ¹⁷⁸. Όσο αφορά το δεύτερο συστατικό του μεταξιού, τη φιμπροΐνη, αυτή αποτελείται από τα επαναλαμβανόμενα αμινοξέα γλυκίνη (45%), αλανίνη (30%) και σερίνη (12%) σε αναλογία περίπου 3: 2: 1, συνδεδεμένα με δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των β-φύλλων. Έτσι παρουσιάζεται η αλληλουχία [gly-al-gly-al-gly-al-gly-ser]_n στην φιβροΐνη με πλευρικές αλυσίδες H, CH₃, H, CH₃, H και CH₂OH ¹⁷⁷, αντίστοιχα (**Εικόνα 1-30**).



Εικόνα 1-30. Απεικόνιση της δομής του μεταξιού, επάνω η δομή της σερικίνης, κάτω η δομή της φιμπροΐνης.

1.8.11.1. Υβριδικά υλικά με χρήση της σερικίνης ως αντιοξειδωτικής μονάδας

Η σερικίνη συνήθως απομακρύνεται κατά τη διαδικασία αποκομμίωσης και εξάγεται σε σημαντικές ποσότητες ως υποπροϊόν των μεταξωτών κουκουλιών κατά την παραγωγή μεταξιού στην κλωστοϋφαντουργία ^{179,180}. Ωστόσο, αποτελεί μια πολύ υποσχόμενη πηγή βιοπολυμερούς λόγω της ευκολίας εξαγωγής της και της διαθεσιμότητάς της σε μεγάλες ποσότητες ¹⁷⁸. Πρόσφατες εξελίξεις στην έρευνα όσον αφορά τη σερικίνη αποκάλυψαν ότι η απορριφθείσα σερικίνη διαθέτει

εξαιρετικές βιολογικές δραστηριότητες συγκρίσιμες με εκείνες της φιμπροΐνης^{181,182}, επιτρέποντας την εφαρμογή της σε ποικίλα πεδία¹⁸³. Η σερίκίνη έχει μοριακό βάρος που κυμαίνεται από 24 έως 400 kDa και αποτελείται κυρίως από περίπου 40% σερίνη, 16% γλυκίνη και ένα αξιοσημείωτο ποσοστό υπολειμμάτων ασπαρτικού οξέος¹⁸⁴. Η πρωτεΐνη σερίκίνη αποτελείται από 18 διακριτά αμινοξέα, με τη σερίνη, την ιστιδίνη, τη γλυκίνη, τη θρεονίνη, την τυροσίνη, το ασπαρτικό οξύ και το γλουταμικό οξύ να είναι τα πιο διαδεδομένα, τα περισσότερα από τα οποία ταξινομούνται ως πολικά^{185,186}. Η σερίνη είναι το πιο διαδεδομένο αμινοξύ στη σερίκίνη, ακολουθούμενη από το ασπαρτικό οξύ και τη γλυκίνη¹⁸⁷.

Το αντιοξειδωτικό δυναμικό της σερίκινης αποδίδεται στην υψηλή περιεκτικότητά της σε αμινοξέα με ομάδες υδροξυλίου, κυρίως σερίνη. Αυτές οι υδροξυλομάδες λειτουργούν ως χηλικοί παράγοντες¹⁸⁵. Η παρουσία φαινολικών και φλαβονοειδών ενώσεων στα γειτονικά στρώματα της πρωτεΐνης σερίκινης όχι μόνο προσδίδει χρωματισμό στο κουκούλι αλλά επίσης ενισχύει την αντιοξειδωτική δράση της σερίκινης^{188,189}. Η αντιοξειδωτική δράση της σερίκινης είναι μια ιδιαίτερα σημαντική ιδιότητα, καθώς έχει τη δυνατότητα να προσφέρει οφέλη για την υγεία και να χρησιμεύσει ως φυσικό συντηρητικό στη βιομηχανία τροφίμων (**Εικόνα 1-31**)¹⁸⁵. Έχει αποδειχθεί ότι η σερίκίνη επιδεικνύει ένα ευεργετικό αποτέλεσμα, εξουδετερώνοντας τις ελεύθερες ρίζες που εμπλέκονται στην οξειδωτική βλάβη^{190,191}.

Χρησιμοποιώντας τροποποίηση, καταβύθιση ή διασταύρωση με άλλα πολυμερή, η σερίκίνη μπορεί να αναπτυχθεί σε καινούρια πιο σταθερά και ελεγχόμενα βιοϋλικά. Αυτά τα βιοϋλικά μπορούν να ρυθμιστούν με ακρίβεια όσον αφορά τη μορφολογία, το μέγεθος και τις ιδιότητες, όπως η ελαστικότητα, η αντοχή στον εφελκυσμό και η βιοαποικοδομησιμότητα^{192,193} (**Εικόνα 1-31**). Οι Das *et al* εξήγαγαν ακατέργαστη σερίκίνη από τα μεταξωτά κουκούλια του *Bombyx mori* και χρησιμοποίησαν το εκχύλισμα σερίκινης ως αναγωγικό μέσο για τη σύνθεση νανοσωματιδίων χρυσού. Στη συνέχεια, αξιολόγησαν τις βιοδραστικές ιδιότητες αυτών των νανοσωματιδίων χρυσού, εστιάζοντας στην αντιοξειδωτική και αντιβακτηριακή δράση καθώς και στην ικανότητα επούλωσης των τραυμάτων. Η αντιοξειδωτική δράση του υλικού SPP-AuNPS μελετήθηκε με τη χρήση μεθόδων DPPH, ABTS, TAC και RPA¹⁷⁴. Τα φορτωμένα με κουρκουμίνη νανοσωματίδια σερίκινης (Cur-SNPs) παρασκευάστηκαν με τη χρήση μιας τροποποιημένης μεθόδου απαλοιφής, ακολουθούμενης από διασύνδεση με γενιπίνη (Gn), από τους Kanoujia *et al*. Η αντιοξειδωτική δράση μελετήθηκε *in vivo* σε αρουραίους¹⁸⁴.



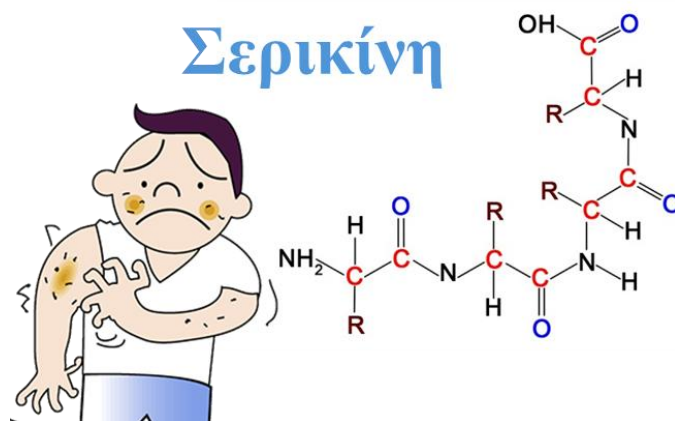
Εικόνα 1-31. Σχηματική απεικόνιση των πηγών της σερικίνης, των διαφόρων μεθόδων εκχύλισης, των φυσικοχημικών ιδιοτήτων της καθώς και των εφαρμογών της σε βιοϊατρικούς και φαρμακευτικούς τομείς (Εικόνα τροποποιημένη από Silva, A. S.; Costa, E. C.; Reis, S.; Spencer, C.; Calhelha, R. C.; Miguel, S. P.; Ribeiro, M. P.; Barros, L.; Vaz, J. A.; Coutinho, P. Silk Sericin: A Promising Sustainable Biomaterial for Biomedical and Pharmaceutical Applications. *Polymers (Basel)*. **2022**)¹⁹⁴.

Η σερικίνη είναι μια ευπροσάρμοστη πρωτεΐνη που μπορεί να προσαρμοστεί σε μεμβράνες για χρήση σε βιοϊατρικές και διατροφικές εφαρμογές. Επιπλέον, η σερικίνη μπορεί να διαμορφωθεί σε νανοσωματίδια σερικίνης (SN), τα οποία στη συνέχεια μπορούν να ενσωματωθούν σε μεμβράνες για να βελτιώσουν τις ιδιότητες φραγμού των μεμβρανών¹⁹⁵. Τα νανοσωματίδια σερικίνης (SN) μπορούν να συντεθούν και να ενσωματωθούν σε νανοςύνθετα φιλμ με βάση τη σερικίνη¹⁹⁶. Η αντιοξειδωτική δράση των μεμβρανών αξιολογήθηκε με τη δοκιμασία 2,2-διφαινυλο-1-πικρυλ-υδραζυλίου (DPPH)¹⁹⁵. Συντέθηκαν επίσης νανοσωματίδια σερικίνης χρησιμοποιώντας κροκετίνη ως νέο βιοενεργό φυσικό διασυνδετικό (NPc) και συγκρίθηκαν με νανοσωματίδια σερικίνης διασυνδεδεμένα με γλουταραλδεϋδη (NPg)¹⁹⁷. Η δραστηριότητα απορρόφησης δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS) των νανοσωματιδίων με βάση τη

σερικήνη αξιολογήθηκε με τη χρήση της δοκιμασίας 2,2-διφαινυλο-1-πικρυλ-υδραζολίου (DPPH)¹⁹⁷.

Οι Shankar *et al* συνέθεσαν νανοσωματίδια SS-MgO μέσω σύζευξης της πρωτεΐνης σερικήνης με νανοσωματίδια οξειδίου του μαγνησίου. Η αντιοξειδωτική δράση των συντιθέμενων σωματιδίων αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας διάφορες μεθοδολογίες, συμπεριλαμβανομένης της ανάλυσης DPPH¹⁹⁸. Οι Orlandi *et al* ανέπτυξαν νανοσωματίδια με βάση τη σερικήνη που ενθυλακώνουν φυσικές πολυφαινόλες, συμπεριλαμβανομένων των προανθοκυανιδινών (P), της κερκετίνης (Q) και της γαλλικής επιγαλλοκατεχίνης (EGCG). Η αντιοξειδωτική τους δράση αξιολογήθηκε με τη χρήση της δοκιμασίας DPPH¹⁹⁹. Επιπλέον, οι Mumtaz *et al* συνέθεσαν νέα νανοσωματίδια, μέσω της ενσωμάτωσης σερικήνης με νανοσωματίδια αργύρου, (S-AgNPs) και αξιολόγησαν την αντιοξειδωτική τους δράση χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία DPPH²⁰⁰.

Η σερικήνη, η οποία είναι υπεύθυνη για τις αντιγονικές ιδιότητες του μεταξιού, παίζει καθοριστικό ρόλο στη διαφύλαξη του υλικού. Προσδίδει στις μεταξωτές ίνες αντοχή στην υπεριώδη ακτινοβολία, αντιβακτηριακή δράση και αντοχή στην οξείδωση²⁰¹. Ωστόσο, η παρουσία σερικήνης μπορεί να συμβάλει στη σκληρότητα των μεταξωτών ινών¹⁷². Παρότι το μετάξι είναι ένα τόσο επιθυμητό προϊόν με εξαιρετικές ιδιότητες, η άμεση επαφή του με το δέρμα μπορεί να επιφέρει κάποιες επιβλαβείς επιπτώσεις. Συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί ότι το μετάξι προκαλεί αιμόλυση όταν έρχεται σε άμεση επαφή με το δέρμα, ένας παράγοντας που χρήζει προσοχής¹⁷². Η ευαισθησία ορισμένων ανθρώπων στο μετάξι οφείλεται στην αλλεργία που προκαλείται από την σερικήνη (**Εικόνα 1-32**)¹⁷². Κατά συνέπεια, προκειμένου να βελτιωθεί η απτική εμπειρία και η λάμψη του μεταξιού, καθίσταται απαραίτητη η απομάκρυνση ή η μείωση της περιεκτικότητας σε σερικήνη¹⁷². Το βήμα αυτό είναι ιδιαίτερα κρίσιμο για τα άτομα που είναι επιρρεπή σε αλλεργίες που σχετίζονται με τη σερικήνη, οι οποίες μπορεί να εκδηλωθούν ως άσθμα, αναφυλαξία ή τοπικές δερματικές αντιδράσεις (**Εικόνα 1-32**)²⁰¹. Αναγνωρίζοντας αυτές τις πτυχές, είναι επιτακτική ανάγκη τα άτομα με γνωστές ευαισθησίες ή αλλεργίες στη σερικήνη να είναι προσεκτικά όταν χρησιμοποιούν προϊόντα μεταξιού σε άμεση επαφή με το δέρμα τους.



Εικόνα 1-32. Απεικόνιση των αλλεργικών επιπτώσεων που μπορούν να προκληθούν από την άμεση επαφή της σερικίνης με το ανθρώπινο δέρμα.

Για την αντιμετώπιση των προβλημάτων και των αλλεργιών που προέρχονται από την σερικίνη, χρησιμοποιείται η διεργασία της αποκομμίωσης του μεταξιού ως μέσο για την εξάλειψη της σερικίνης από τις μεταξωτές ίνες ¹⁷². Η διαδικασία αυτή επιτυγχάνεται μέσω της υδρόλυσης των πεπτιδικών δεσμών εντός της πρωτεΐνης σερικίνης, οδηγώντας στην αποικοδόμησή της και την επακόλουθη απομάκρυνσή της από τη μεταξωτή μήτρα ¹⁷³. Μέσα στο φάσμα των διαδικασιών αποκομμίωσης, η κατεξοχήν τεχνική είναι η χρήση αλκαλίων, τα οποία επιλέγονται ειδικά για την αποτελεσματικότητά τους στην ελαχιστοποίηση της βλάβης που μπορεί να επέλθει στις ίνες του μεταξιού. Ειδικότερα, τα αλκάλια διευκολύνουν τη δημιουργία χημικών δεσμών μεταξύ αλκαλίων και σερικίνης καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας υδρόλυσης ¹⁷². Η χρονική διάρκεια της διαδικασίας αποκομμίωσης έχει αμελητέο αντίκτυπο στα δευτερεύοντα δομικά χαρακτηριστικά της ίνας του μεταξιού ²⁰¹. Οι μεταξωτές ίνες απουσία σερικίνης παρουσιάζουν ανώτερες μηχανικές ιδιότητες σε σύγκριση με τις αντίστοιχες άθικτες ίνες, οι οποίες συνήθως περιλαμβάνουν σερικίνη

¹⁷²

1.8.11.2. Υβριδικά υλικά με υλικό υποστήριξης το μετάξι (silk fiber)

Τα τελευταία χρόνια, η ζήτηση στην αγορά για έξυπνα υλικά φυσικής προέλευσης έχει αυξηθεί σημαντικά. Έτσι, για τη βελτίωση ορισμένων μειονεκτημάτων που εμφανίζει το μετάξι έγιναν προσπάθειες επιφανειακής τροποποίησης των μεταξωτών ινών μέσω οργανικών ή ανόργανων ειδών. Η επιδίωξη αυτή αποσκοπεί στην προώθηση λειτουργικών υλικών που

προέρχονται από το μετάξι ¹⁷³. Σε προηγούμενη έρευνα που διεξήχθη στο εργαστήριό μας, οι Georgiou *et al*, διαπίστωσαν ότι η ομοιοπολική τροποποίηση της επιφάνειας του μεταξιού με είδη μεταλλο-οργανικού πλαισίου (σκελετού framework) ζirkονίου [ZrMOF] δίνει υβριδικά υλικά ικανά να απομακρύνουν αποτελεσματικά το αρσενικό από υδατικά διαλύματα ²⁰². Στην υπάρχουσα βιβλιογραφία καταγράφονται πολυάριθμες περιπτώσεις χημικής τροποποίησης της επιφάνειας των μεταξωτών ινών μέσω τεχνικών εμβολιασμού. Μεταξύ αυτών, αρκετές ερευνητικές ομάδες ασχολήθηκαν με τον εμβολιασμό μεθακρυλικού μεθυλίου (MMA) σε μεταξωτές ίνες ^{203–207}.

Οι Ojah *et al*, πραγματοποίησαν επιφανειακές τροποποιήσεις σε μεταξωτές ίνες χρησιμοποιώντας τόσο μεθακρυλικό μεθύλιο (MMA) όσο και ακρυλαμίδιο (AAm), παράγοντας έτσι δύο νέα υλικά με βάση το μετάξι ²⁰⁸. Οι Kameda *et al*, πέτυχαν την επιφανειακή τροποποίηση των μεταξωτών ινών μέσω της ενσωμάτωσης μεθακρυλαμιδίου (MAA) ²⁰⁹. Επίσης συντέθηκαν υβριδικά υλικά όπως, 2-μεθακρυλοϋλοξυαιθυλοφωσφορυλοχολίνη (MPC) ²¹⁰, ακρυλικό αμίδιο (βινυλικό μονομερές) ²¹¹, διμεθακρυλική διαιθυλενογλυκόλη (EGDMA-2) ²¹², φωσφορικός διαιθυλ-2-(μεθακρυλοϋλοξυαιθυλεστέρας) (DEMEP) ²¹³, 2-υδροξυαιθυλομεθακρυλικό (HEMA) ²⁰⁵ και βινυλοτριμεθοξυσιλάνιο (VTMSi) με τον εμβολιασμό αυτών στην επιφάνεια του μεταξιού ²¹⁴.

Οι Wang *et al*, πέτυχαν σύζευξη μεταξωτών ινών με NeutraAvidin μέσω της χημείας καρβοδιιμιδίου, χρησιμοποιώντας αντιδράσεις με τη μεσολάβηση καρβοδιιμιδίου ²¹⁵. Από την άλλη πλευρά, οι Jin *et al*, εφάρμοσαν μια τεχνική ανάμειξης για την τροποποίηση της επιφάνειας του μεταξιού με πολυ(οξειδίου του αιθυλενίου) (PEO) ²¹⁶. Επιπλέον, η τυροσίνη εμβολιάστηκε στις ίνες του μεταξιού χρησιμοποιώντας μια αντίδραση σύζευξης διαζωνίου ²¹⁷. Η τροποποίηση του μεταξιού με αυξητικό παράγοντα προερχόμενο από αιμοπετάλια (PDGF) έχει επιτευχθεί, με ενσωμάτωση δύο υλικών μέσω τρισδιάστατων εμφυτευμένων υφασμάτων χρησιμοποιώντας τη μεθοδολογία προσθετικής κατασκευής ²¹⁸.

Η επιφάνεια του μεταξιού υποβλήθηκε σε τροποποίηση μέσω διαφόρων μεθόδων: βιοσύνδεση με φωτογόνα που εκπέμπουν ερυθρό, πράσινο και μπλε χρώμα (AIEgens) ²¹⁹, προσκόλληση χιτοζάνης μέσω ανυδριδικού δεσμού ²²⁰, ενσωμάτωση οξειδίου του γραφενίου με επαναλαμβανόμενη διαδικασία επικάλυψης RGO ²²¹ και ομοιοπολικός εμβολιασμός με μεθακρυλικό μεθύλιο (MMA) και τριβουτυλοσιλυλομεθακρυλικό εστέρα (TBSiMA) μέσω

πολυμερισμού RAFT (Reversible Addition-Fragmentation chain Transfer) ¹⁷⁷. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε νανο-SiO₂ για την επικάλυψη της επιφάνειας του μεταξιού χρησιμοποιώντας μια μέθοδο φινιρίσματος ²²². Οι Zainudin *et al*, χρησιμοποίησαν (3-αμινοπροπυλο)τριμεθοξυσιλάνιο για τη δημιουργία εποξειδικών σύνθετων υλικών σε μεταξωτές ίνες που προέρχονται από μεταξωτά κουκούλια ²²³. Επιπλέον, οικονομικά αποδοτικά ανάλογα ντοπαμίνης, δηλαδή αλκαλική λιγνίνη και ταννικό οξύ, χρησιμοποιήθηκαν στην κατασκευή ιδιαίτερα δραστικών μεταξωτών ινών (SF) μεταξοσκώληκα μέσω μιας απλής τεχνικής εμβάπτισης ²²⁴.

Ένα ανοσορυθμιστικό ικρίωμα ινώδους πολυκαπρολακτόνης (PCL) υποβλήθηκε σε τροποποίηση μέσω μιας μεθόδου συναρμολόγησης στρώμα προς στρώμα ενός συστατικού, ενσωματώνοντας την φιβροΐνη μεταξιού (SF). Επιπρόσθετα, ο μηχανικός αυξητικός παράγοντας (MGF) ενσωματώθηκε περίτεχνα στην ινοβρωμίνη μεταξιού χρησιμοποιώντας τεχνικές χημείας κλικ ²²⁵. Οι Peng *et al* συνέθεσαν ένα κράμα, ένα σύνθετο υλικό που περιείχε φιβροΐνη του μεταξιού και φωσφορικό οκτα-ασβέστιο χρησιμοποιώντας τεχνολογία ξήρανσης με κατάψυξη. Στη συνέχεια, βελτίωσαν τα επιφανειακά χαρακτηριστικά των ικριωμάτων που αποξηράθηκαν με κατάψυξη μέσω μιας διαδικασίας αυτοπολυμερισμού με χρήση ντοπαμίνης ²²⁶. Εναλλακτικές μεθοδολογίες περιλαμβάνουν τη χρήση του SF, το οποίο περιέχει μόνο φιβροΐνη μέσω εναπόθεσης πολυηλεκτρολύτη στρώμα-προς-στρώμα σε διαλύματα που περιλαμβάνουν κατιονική υδροχλωρική πολυ(αλλυλαμίνη) (PAH) και ανιονικό πολυ(ακρυλικό οξύ) (PAA) ²²⁷. Άλλες στρατηγικές σύνθεσης περιλαμβάνουν τη χρήση της φιβροΐνης του μεταξιού μέσω εναπόθεσης πολυηλεκτρολύτη στρώμα προς στρώμα, όπου βυθίζεται σε διαλύματα που περιέχουν κατιονική υδροχλωρική πολυ(αλλυλαμίνη) (PAH) και ανιονικό πολυ(ακρυλικό οξύ) (PAA) ²²⁸. Οι Aslanidou *et al*, ανέπτυξαν μια νέα μέθοδο για την σύνθεση υβριδικών υλικών σε μετάξι μέσω επικάλυψης, αποδίδοντας επιφάνειες που χαρακτηρίζονται από υπερυδρόφοβες και υπερ-ολεοφοβικές ιδιότητες ²²⁹. Επίσης, οι Baek *et al*, χρησιμοποίησαν μια μεθοδολογία για τη διερεύνηση του μηχανισμού πολυμερισμού του γαλλικού οξέος (GA) εντός των μεταξωτών ινών ²³⁰.

Σε ότι αφορά υβριδικά υλικά που έχουν ως υλικό υποστήριξης το αποκομμιωμένο μετάξι υπάρχει πολύ λίγη βιβλιογραφία ως προς την μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης αυτών των υβριδικών υλικών.

1.9. Σκοπός Διδακτορικής Διατριβής

Το αντικείμενο της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν [i] η τροποποίηση ινών του μεταξιού με σκοπό την ανάπτυξη αντιοξειδωτικών υβριδικών υλικών, [ii] η αξιολόγηση της δράσης των υβριδικών υλικών έναντι των ριζών DPPH και [iii] έναντι των ριζών OH.

Σε αυτό το πλαίσιο οι εξειδικευμένοι στόχοι που τέθηκαν ήταν:

- α) Η δημιουργία υβριδικών υλικών με υλικό υποστήριξης ίνες μεταξιού και ως αντιοξειδωτικά D-Γλυκουρονικό οξύ, N-Ακετυλ- D-Γλυκοζαμίνη, ως μονομερή του υαλουρονικού οξέος και το Γαλλικό οξύ, με ομοιοπολική ακινητοποίηση τους στη μεταξωτή μήτρα.
- β) Χαρακτηρισμός όλων των υβριδικών υλικών.
- γ) Αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης των υβριδικών υλικών έναντι των ριζών DPPH με τη χρήση φασματοσκοπίας UV-Vis, ακολουθούμενη από την κατανόηση του μηχανισμού δράσης των αντιοξειδωτικών υλικών.
- δ) Αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης των υβριδικών υλικών ως προς τις ρίζες OH με τη χρήση φασματοσκοπίας EPR και κατανόηση του μηχανισμού δράσης τους.
- ε) Σύγκριση της δράσης των υβριδικών υλικών ως αντιοξειδωτικά έναντι ριζών DPPH και ριζών OH.

2. Κεφάλαιο: Πειραματικό Μέρος

2.1. Χημικά- Αντιδραστήρια και Τεχνικές Χαρακτηρισμού

Όλες οι οργανικές ενώσεις, οι διαλύτες και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρούσα εργασία παρουσιάζονται στον πιο κάτω πίνακα (Πίνακας 2-1).

Πίνακας 2-1. Παρουσιάζονται όλα τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	
Silk fiber	Μετάξι Τσακίρης Γιώργος, έμπορος μεταξιού, Αλεξανδρούπολη
Gallic Acid $C_7H_6O_5$	Γαλλικό οξύ , από τη Sigma Aldrich (G7384-1KG)
D-Glucuronic acid $C_6H_{10}O_7$	D-Γλুকουρονικό οξύ , καθαρότητας $\geq 98\%$ από τη Sigma Aldrich (G5269-10G)
N-Acetyl-D-Glucosamine $C_8H_{15}NO_6$	N-Ακετυλ-D-Γλυκοζαμίνη , καθαρότητας $\geq 99\%$ από τη Sigma Aldrich (A8625-5G)
Silica gel SiO_2	Κολλοειδής σίλικα , καθαρότητας $\geq 99\%$ από τη Sigma Aldrich (236837-1kg)
Sericin	Σερικίνη , DSM Nutritional Product Europe Ltd (5033608)
(3-Aminopropyl) triethoxysilane $H_2N(CH_2)_3Si(OC_2H_5)_3$	(3-Αμινοπροπυλ)τριαεθοξυ-σιλάνιο , καθαρότητας 99% από τη Sigma Aldrich (440140-100ml)
(3-Chloropropyl) trimethoxysilane $Cl(CH_2)_3Si(OCH_3)_3$	(3-Χλωροπροπυλ)τριμεθοξυ-σιλάνιο , καθαρότητας $\geq 97\%$ από τη Sigma Aldrich (440183-100ml)
Potassium bromide KBr	Βρωμιούχο κάλιο , για φασματοσκοπία υπερύθρου, από την Merk Millipore (104907)
N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride EDC	Υδροχλωρικό N-[3-(διμεθυλαμινο)προπυλ]-N'-αιθυλοκαρβοδιιμίδιο , καθαρότητας $\geq 98\%$ από τη Sigma Aldrich (03450-5G)
2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl DPPH	2,2-Διφαινυλο-1-πικρυλδραζύλιο (D9132-1G)
Ferrous (II) sulfate Heptahydrate $FeSO_4 \cdot 7H_2O$	Θεικός σίδηρος Ενυδατωμένος (7 H_2O) , καθαρότητας $>95\%$ από τη Fluka (44970-250G)
Hydrogen Peroxide solution H_2O_2	Διάλυμα Υπεροξειδίου του Υδρογόνου , $30\%wt$ από τη Sigma Aldrich (216763-100ML)
5,5-dimethyl-pyrroline N-oxide $C_6H_{11}NO$ DMPO	N-οξείδιο της 5,5-διμεθυλοπυρρολίνης , καθαρότητας $>97.0\%$ από τη TCI (D2363-5G)

Sodium carbonate Na ₂ CO ₃	Ανθρακικό Νάτριο , άνυδρο από τη Sigma Aldrich (223484-500G)
ΔΙΑΛΥΤΕΣ	
Acetone CH ₃ COCH ₃	Ακετόνη καθαρότητας ≥ 99.8% από τη Merk Millipore (1000141011)
Ethanol CH ₃ CH ₂ OH	Αιθανόλη καθαρότητας ≥ 99.9% από τη Merk Millipore (1009831011)
Methanol CH ₃ OH	Μεθανόλη καθαρότητας ≥ 99.9% από τη Merk Millipore (1060091011)
Diethyl Ether (C ₂ H ₅) ₂ O	Διαιθυλαιθέρας καθαρότητας >99.8% από τη Honeywell (603-022-00-4-2.5L)
Deuterium oxide D ₂ O	Οξείδιο του Δευτερίου , καθαρότητας >99.9% από τη Deutero (00506-25ML)
Methyl alcohol-d4 CD ₃ OD	Μεθυλική αλκοόλη-d4 , καθαρότητας >99.8% από τη Deutero (01105-25ML)
Water for chromatography LC-MS Grade	Νερό χρωματογραφίας , LC-MS Grade από τη Merck (1.15333.2500-2.5L)

Τεχνικές Χαρακτηρισμού:

2.1.1. Φασματοσκοπία Υπερύθρου FT-IR

Η φασματοσκοπία Υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR) κατατάσσεται στον τομέα των δονητικών φασματοσκοπιών, οι οποίες χρησιμεύουν ως βασικά εργαλεία για πολύπλευρες αναλύσεις. Οι δονητικές φασματοσκοπίες χαρακτηρίζονται από εγγενή απλότητα, αναπαραγωγικότητα και μη επεμβατική φύση προς το δείγμα. Κεντρικό ρόλο στην αποτελεσματικότητά τους παίζει η ικανότητα αξιοποίησης ελάχιστων ποσοτήτων υλικού (μικρογραμμάρια ή νανογραμμάρια) και η ελαχιστοποίηση των χρονικών απαιτήσεων που συνδέονται με την προετοιμασία του δείγματος. Μέσω της εφαρμογής της φασματοσκοπίας FT-IR, είναι εφικτή η κατανόηση των ενώσεων σε μοριακό επίπεδο, διευκολύνοντας την εξέταση λειτουργικών τμημάτων, τύπων δεσμών και μοριακών διαμορφώσεων. Οι φασματικές ζώνες που εμφανίζονται φέρουν χαρακτηριστικά μοναδικά για κάθε μόριο, παρέχοντας άμεσες και αξιόπιστες πληροφορίες σχετικά με τη μοριακή δομή. Η υψηλή ευκρίνεια των ζωνών, η δυνατότητα υψηλής ανάλυσης καθώς και η ευαισθησία τους σε παράγοντες όπως η μοριακή

γεωμετρία, η διαμόρφωση και οι συνθήκες του περιβάλλοντος, καθιστούν τις τεχνικές αυτές εξαιρετικά ισχυρά εργαλεία για τη δομική ανάλυση.²³¹

Σύμφωνα με τις αρχές της κβαντομηχανικής, ένα μόριο έχει την ικανότητα να απορροφά διακριτές μονάδες ενέργειας, επιτρέποντάς του να μεταβεί στο πρώτο δονητικό ενεργειακό επίπεδο. Κατά την έκθεση σε ένα συνεχές φάσμα υπέρυθρης ακτινοβολίας, το μόριο απορροφά επιλεκτικά φωτόνια που διαθέτουν ενέργεια ισοδύναμη με εκείνη που απαιτείται για την ανύψωσή του σε πρώτο ενεργειακό επίπεδο. Κατά συνέπεια, το φάσμα της ακτινοβολίας που παραμένει παρουσιάζει χαρακτηριστικές ζώνες απορρόφησης σε συγκεκριμένες συχνότητες, ενδεικτικές της περίπλοκης αλληλεπίδρασης μεταξύ της δυναμικής δόνησης και της περιστροφής του μορίου.²³² Αυτή η φασματοσκοπική τεχνική βρίσκει διαδεδομένη εφαρμογή σε μη υδατικά διαλύματα, κυρίως λόγω της πρόκλησης που θέτει η έντονη απορρόφηση του νερού. Η απορρόφηση υπέρυθρης ακτινοβολίας αποδίδεται κυρίως σε μοριακές δονήσεις που προκαλούν μεταβολές στη διπολική ροπή, γεγονός που καθιστά ενεργές τις δονητικές μεταπτώσεις. Τυπικά παραδείγματα αποτελούν οι δονήσεις O-H, N-H και C=O. Ειδικότερα η φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR) εκμεταλλεύεται τις μεταβολές των διπολικών ροπών κατά την διάρκεια των δονητικών κινήσεων.²³¹ Η ακτινοβολία συλλαμβάνεται σχολαστικά σε ολόκληρο το φάσμα μήκους κύματος μέσω μιας ενδομετρικής διάταξης. Η λειτουργία μετάδοσης (transmission mode) αποτελεί τη βασική διαταξιακή επιλογή στη φασματοσκοπία υπερύθρου, κατά την οποία στερεά δείγματα, συνήθως σε μορφή λεπτής σκόνης, ενσωματώνονται ομοιογενώς σε μήτρα διαφανούς προς την υπέρυθρη ακτινοβολία, όπως KBr ή το KCl για τη δημιουργία δισκίων κατάλληλων για φασματοσκοπική ανάλυση. Τα μείγματα συμπιέζονται στη συνέχεια σε δισκία υπό υψηλή πίεση με τη χρήση ενός καλουπιού. Η ποιότητα του προκύπτοντος φάσματος εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ομοιομορφία του μίγματος, την κατανομή του μεγέθους των σωματιδίων και τη συμπαγή μορφή του δισκίου.²³²

Για την παρούσα διατριβή, όλες οι μετρήσεις στο υπέρυθρο με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR) πραγματοποιήθηκαν με την χρήση δισκίων KBr με φασματοφωτομέτρο Nicolet™ IS-5™ FT-IR. Το προκύπτον φάσμα αντιπροσωπεύει το μέσο όρο 32 μεμονωμένων φασμάτων που αποκτήθηκαν στην περιοχή $400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$, χρησιμοποιώντας φασματική ανάλυση 2 cm^{-1} . Η σκόνη μορφοποιήθηκε και συμπίεστηκε μονοαξονικά (10N) με τη χρήση υδραυλικής πρέσας, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό συμπιεσμένου δισκίου διαμέτρου 1 cm και πάχους 1-15 mm.

Όλα τα δείγματα που υποβλήθηκαν σε φασματοσκοπική ανάλυση FT-IR ήταν σε στερεά κατάσταση, γεγονός που επέβαλε τη χρήση συμπιεσμένων δισκίων βρωμιούχου καλίου (KBr), όπως περιγράφηκε προηγουμένως. Για να διευκρινιστεί περαιτέρω, κάθε δισκίο προετοιμάστηκε σχολαστικά με την ανάμειξη μιας ελάχιστης ποσότητας σκόνης δείγματος (περίπου 5% κ.β.) με σκόνη KBr (περίπου 95% κ.β.). Για να επιτευχθεί η επιθυμητή τελική σύσταση των δισκίων, ήταν επιτακτική η ομογενοποίηση των δύο συστατικών σε ένα αχάτινο γουδί μέχρι να αποκτήσουν μορφή λεπτής σκόνης. Η διαδικασία άλεσης είναι ζωτικής σημασίας καθώς απαιτείται η λεπτομερής και ομοιόμορφη κονιορτοποίηση των δειγμάτων, προκειμένου να εξασφαλιστούν μεγέθη σωματιδίων μικρότερα από το μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας που εκπέμπεται από την πηγή του οργάνου. Αυτή η διαδικασία μετριάζει τα φαινόμενα σκέδασης που διαφορετικά θα μπορούσαν να επηρεάσουν τη φασματική εμφάνιση. Μετά την ομογενοποίηση, το δείγμα μεταφέρεται προσεκτικά σε ένα ειδικό καλούπι, υποβάλλεται σε υδραυλική πίεση και στη συνέχεια εισάγεται στο όργανο.

2.1.2. Φασματοσκοπία Raman

Η φασματοσκοπία Raman διευκρινίζει τη διαδικασία της ανελαστικής σκέδασης φωτονίων από ένα κβαντισμένο μοριακό σύστημα. Οι δονητικές καταστάσεις των μορίων χρησιμεύουν κατά κύριο λόγο, ως μηχανισμός σκέδασης, αποδίδοντας έτσι τον χαρακτηρισμό της φασματοσκοπίας Raman ως δονητικής φασματοσκοπικής τεχνικής.²³³ Για σωστό και ολοκληρωμένο χαρακτηρισμό των μοριακών δονήσεων η φασματοσκοπία δονήσεων Raman χρησιμεύει συνήθως ως συμπληρωματική τεχνική της φασματοσκοπίας απορρόφησης στο υπέρυθρο (IR). Όπως προαναφέρθηκε, στη φασματοσκοπία Raman, η δονητική διέγερση πραγματοποιείται μέσω ενός μηχανισμού σκέδασης φωτονίων. Λόγω της εξατομικευμένης φύσης των μοριακών δονήσεων, οι φασματοσκοπίες δόνησης χρησιμεύουν ως «μοριακά αποτυπώματα» για αναλύσεις τόσο ανόργανων και οργανικών μορίων, όσο και περίπλοκων συστημάτων όπως τα βιολογικά κύτταρα και οι ιστοί.²³³ Η φασματοσκοπία Raman θεωρείται ως ένα από τα πιο ισχυρά εργαλεία για βιοαναλυτικές και βιοϊατρικές εφαρμογές.²³⁴

Η δονητική φασματοσκοπία Raman βασίζεται σε τρεις κύριες σκεδάσεις: (α) τη σκέδαση Rayleigh, όπου η αρχική και η τελική κατάσταση σκέδασης παραμένουν πανομοιότυπες, (β) τη

σκέδαση Stokes, όπου η ενέργεια μεταφέρεται από το προσπίπτον φωτόνιο στο μόριο, και έτσι η τελική κατάσταση σκέδασης διεγείρεται σε μια υψηλότερη κβαντική κατάσταση. Από την άλλη, εάν ένα μόριο μεταβαίνει από μια διεγερμένη κβαντική κατάσταση σε μια βασική κατάσταση, τότε το φαινόμενο αυτό ονομάζεται (γ) σκέδαση anti-Stokes, όπου η ενέργεια μεταφέρεται από το μοριακό κβαντικό σύστημα στο φωτόνιο.²³³

Τα φάσματα Raman αποκτήθηκαν με τη χρήση φασματογράφου HORIBA-Xplora Plus, με ενσωματωμένο μικροσκόπιο Olympus BX41, με χρήση διόδων λέιζερ 785nm για διέγερση. Η δέσμη λέιζερ εστιάστηκε με ακρίβεια στο δείγμα μέσω των οπτικών του μικροσκοπίου. Τα κονιοποιημένα δείγματα τοποθετήθηκαν σε γυάλινη πλάκα και διαμορφώθηκαν σε ελαφρά συμπιεσμένα δισκία. Τα φάσματα συλλέχθηκαν για διάρκεια 10 δευτερολέπτων με συνολικά 50 συσσωρεύσεις, εξασφαλίζοντας επαρκή αναλογία σήματος προς θόρυβο για αξιόπιστη ανάλυση δεδομένων.

2.1.3. Θερμοσταθμική Διαφορική Θερμική Ανάλυση (TG-DTA)

Η μέθοδος της Θερμοσταθμικής Διαφορικής Θερμικής Ανάλυσης (Thermogravimetry Differential Thermal Analysis, TG-DTA) προσφέρει πολύτιμες πληροφορίες για τη δομική σύνθεση των υλικών. Η θερμοβαρυτομετρική ανάλυση (TG) και η διαφορική θερμική ανάλυση (DTA) διεξάγονται ταυτόχρονα για να χαρακτηριστεί ολοκληρωμένα η θερμική συμπεριφορά του δείγματος.²³⁵ Οι πειραματικές διαδικασίες στην παρούσα εργασία διεξήχθησαν χρησιμοποιώντας το όργανο Setaram Labsys™ Evo TG-DTA. Η μεθοδολογία της θερμικής ανάλυσης χρησιμοποιείται για τη διερεύνηση των ιδιοτήτων των υβριδικών υλικών, την εξακρίβωση των θερμοκρασιών αποσύνθεσης και τον προσδιορισμό της αναλογίας των οργανικών προς τις ανόργανες ενώσεις εντός του δείγματος.

Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκε η μεθοδολογία της θερμικής ανάλυσης για την ποσοτικοποίηση της συνολικής απώλειας μάζας που αποδίδεται στην καύση του οργανικού περιεχομένου, αξιολογώντας έτσι την αποτελεσματικότητα της φόρτωσης. Για την περαιτέρω διευκρίνιση της θερμικής ανάλυσης χρησιμοποιήθηκαν οι τεχνικές της θερμοβαρυτομετρικής ανάλυσης (TG) και της διαφορικής θερμικής ανάλυσης (DTA). Στο τέλος του πειράματος,

λαμβάνεται ένα φάσμα που περιλαμβάνει διακριτές καμπύλες που αντικατοπτρίζουν τα συνδυασμένα αποτελέσματα των αναλύσεων TG και DTA. Η καμπύλη DTA καταγράφει τις εξώθερμες και ενδόθερμες μεταπτώσεις που παρουσιάζει το δείγμα καθώς υφίσταται ελεγχόμενη θέρμανση, συγκεκριμένα κατά τη διάρκεια διεργασιών όπως η καύση, σε ένα εύρος αυξανόμενων θερμοκρασιών. Οι εξώθερμοι μετασχηματισμοί αποδίδονται στην καύση οργανικών ομάδων εντός του δείγματος, ενώ οι ενδόθερμοι μετασχηματισμοί συνήθως υποδηλώνουν την παρουσία οργανικών διαλυτών που μπορεί να είναι εγγενείς στο δείγμα. Η θερμοβαρυτομετρική ανάλυση (TG), απεικονίζει τις μεταβολές στο βάρος του υλικού όσον αφορά τις μεταβολές της θερμοκρασίας. Μέσω της ανάλυσης αυτής φαίνεται μια σταδιακή μείωση της μάζας του υλικού, επιτρέποντας την ποσοτικοποίηση της καύσης του οργανικού περιεχομένου στο δείγμα.

Το όργανο που χρησιμοποιήθηκε για τη διενέργεια των προαναφερόμενων αναλύσεων αποτελείται από έναν ευαίσθητο αναλυτικό ζυγό, που αναφέρεται ως θερμοζυγός. Ο θερμοζυγός στεγάζεται σε φούρνο μαζί με την μονάδα ανάλυσης. Για τον χαρακτηρισμό των υλικών χρησιμοποιήθηκαν δείγματα μάζας περίπου 10-30 mg. Η θερμική ανάλυση διεξήχθη σε εύρος θερμοκρασιών από 20 °C έως 700 °C, με ρυθμό θέρμανσης 10 °C/min υπό συνθήκες ροής συνθετικού αέρα.

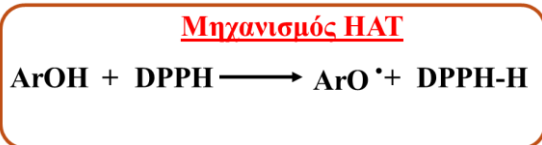
2.1.4. Φασματοσκοπία Υπεριώδους- Ορατού (UV-Vis)

Η φασματοσκοπία UV-Vis είναι μια αναλυτική μέθοδος που φημίζεται για την εξαιρετική ευελιξία της, καθώς έχει την ικανότητα να ανιχνεύει ένα ευρύ φάσμα μορίων. Η ταξινόμησή της ως γενική τεχνική απορρέει από το γεγονός ότι η πλειονότητα των μορίων έχει την ικανότητα να απορροφά ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία στην περιοχή του υπεριώδους-ορατού. Στη φασματοσκοπία UV-Vis, το δείγμα υποβάλλεται σε ακτινοβολία UV-Vis και μετρείται η διαπερατότητα (T) του φωτός που διέρχεται από το δείγμα. Το φάσμα UV εκτείνεται σε μήκη κύματος από 100 έως 400 nm, ενώ το ορατό φάσμα εκτείνεται από 400 έως 700 nm.²³⁶ Επιπλέον, η φασματοσκοπία UV-Vis επιτρέπει τη διερεύνηση φαινομένων μεταφοράς ηλεκτρονίων που συμβαίνουν μεταξύ τροχιακών ατόμων, ιόντων ή μορίων σε διάφορες φάσεις- στερεά, αέρια και υγρά. Ένα σημαντικό πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου έγκειται στην ικανότητά της να διακρίνει

γεγονότα μεταφοράς ηλεκτρονίων σε ατομικό επίπεδο χωρίς παρεμβολές από γειτονικές δονητικές ζώνες.²³⁶

Για τους σκοπούς της παρούσας διατριβής, όλες οι πειραματικές μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με το φασματοφωτόμετρο UV-Vis χαμηλών θερμοκρασιών Hitachi U-2900. Το φασματοφωτόμετρο είναι εξοπλισμένο με έναν εξωτερικό κρυοστάτη Unisoku, ο οποίος ενσωματώνεται στο όργανο και επιτρέπει την ακριβή ρύθμιση της θερμοκρασίας του δείγματος από -100 °C έως +100 °C μέσω μηχανισμών ψύξης και θέρμανσης. Σε πολλές περιπτώσεις, η ψύξη του δείγματος επιβάλλεται και επιτυγχάνεται μέσω ρυθμιζόμενης ροής υγρού αζώτου.

Η μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης των υβριδικών υλικών με τη χρήση φασματοσκοπίας UV-Vis πραγματοποιήθηκε έναντι των ριζών DPPH. Η ρίζα του DPPH επιλέγεται λόγω της σταθερότητάς της και λόγω του ότι εμφανίζει μια χαρακτηριστική κορυφή στα 515 nm στο φασματοφωτόμετρο UV-Vis. Το μεθανολικό διάλυμα της ρίζας DPPH παρουσιάζει χαρακτηριστικό μωβ χρώμα, ενώ η τιμή της απορρόφησης στην ταινία του φάσματος, η οποία αντιστοιχεί στο μήκος κύματος 515 nm, σχετίζεται με τον αριθμό των ριζών που περιέχει το διάλυμα. Αμέσως μετά την προσθήκη ενός αντιοξειδωτικού το μωβ διάλυμα αποχρωματίζεται καθώς παρατηρείται μείωση της έντασης της ταινίας απορρόφησης που εντοπίζεται στο μήκος κύματος των 515 nm. Το πόσο θα μειωθεί η ένταση της κορυφής εξαρτάται από την ικανότητα του αντιοξειδωτικού (ArOH) να εξουδετερώνει τη ρίζα του DPPH και την ικανότητά του να μεταφέρει ένα άτομο υδρογόνου σύμφωνα με το μηχανισμό HAT (**Εικόνα 2-1**) ο οποίος αναλύθηκε εκτενώς στην ενότητα 1.4.3.

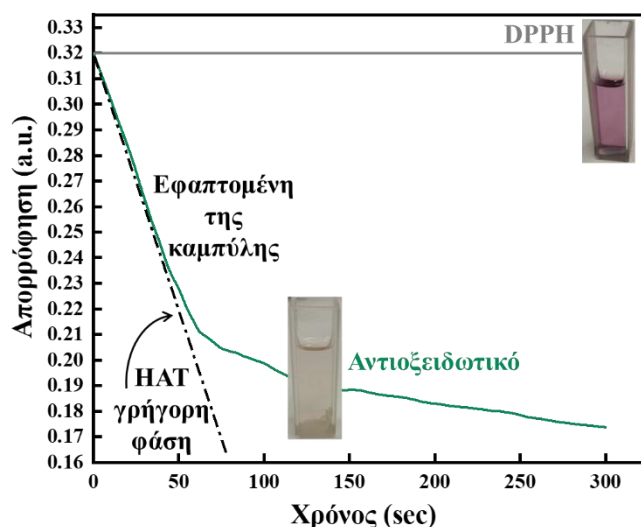


Εικόνα 2-1. Απεικόνιση του μηχανισμού HAT μεταξύ ενός αντιοξειδωτικού και της ρίζας DPPH.

Αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης των υλικών

Αρχικά παρασκευάζεται ένα διάλυμα DPPH/MeOH με συγκέντρωση 4.5mM και τελικού όγκου 3ml. Εν συνεχεία ακολουθεί η κατεργασία του διαλύματος του DPPH/MeOH με υπέρηχους για 5 λεπτά, με τη χρήση του λουτρού υπερήχων Ultrasonic Cleaner (Branson 200). Για κάθε

μέτρηση προστέθηκαν μικροί όγκοι από το πυκνό διάλυμα του DPPH σε κυψελίδα χαλαζία διαμέτρου 1 cm και όγκου 3 ml και αραιώθηκαν με μεθανόλη. Η τελική συγκέντρωση του διαλύματος DPPH/MeOH στην κυψελίδα είναι 30μM. Με την προσθήκη του αντιοξειδωτικού in situ παρακολουθείται η κινητική της αντίδρασης σε μήκος κύματος 515 nm, με χρονικό διάστημα 1 sec.^{87,237,238} Με βάση την κινητική της αντίδρασης εξετάζεται η χρονική εξέλιξη του κάθε φάσματος της ρίζας DPPH όταν αντιδράει με κάθε αντιοξειδωτικό ξεχωριστά. Για τον προσδιορισμό και τον υπολογισμό της κινητικής των αντιδράσεων πρέπει να απομονώνεται το κάθε φάσμα ξεχωριστά και να υπολογίζεται ο αριθμός των ριζών που εξουδετερώνονται και γι' αυτό φέρνουμε εφαπτομένη στην καμπύλη και από εκεί υπολογίζουμε το ποσό των ριζών DPPH που εξουδετερώνονται από το αντιοξειδωτικό (Εικόνα 2-2).



Εικόνα 2-2. Απεικονίζεται η κινητική της αντίδρασης DPPH-αντιοξειδωτικό, με βάση τη μείωση της απορρόφησης των ριζών του DPPH σε σχέση με το χρόνο.

2.1.5. Φασματοσκοπία Ηλεκτρονικού Παραμαγνητικού Συντονισμού (EPR)

Η φασματοσκοπία Ηλεκτρονικού Παραμαγνητικού Συντονισμού (EPR) λειτουργεί ανάλογα με άλλες φασματοσκοπίες που βασίζονται στην απορρόφηση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας. Κάθε μόριο ή άτομο παρουσιάζει διακριτές ενεργειακές καταστάσεις, που αντιστοιχούν σε διακριτά επίπεδα εντός της δομής του. Η φασματοσκοπία περιλαμβάνει την ακριβή μέτρηση και ερμηνεία των ενεργειακών διαφορών που είναι εγγενείς στις ατομικές ή

μοριακές καταστάσεις. Η κατανόηση αυτών των ενεργειακών διαφορών παρέχει ανεκτίμητες πληροφορίες για την ταυτότητα, τη δομική σύνθεση και τη δυναμική συμπεριφορά του υπό εξέταση δείγματος.²³⁹

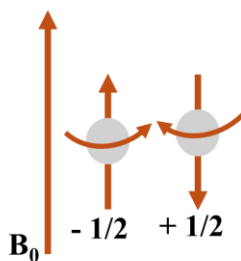
Η ποσοτικοποίηση αυτών των ενεργειακών αποκλίσεων, που απεικονίζονται ως ΔE , καθίσταται εφικτή λόγω μιας θεμελιώδους συσχέτισης μεταξύ της ΔE και της απορρόφησης της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας. Σύμφωνα με το νόμο του Planck, η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία απορροφάται υπό συγκεκριμένες συνθήκες:

$$\Delta E = h\nu$$

Στην πιο πάνω εξίσωση, το h αντιπροσωπεύει τη σταθερά του Planck, ενώ το ν υποδηλώνει τη συχνότητα της ακτινοβολίας. Η απορρόφηση ενέργειας προκαλεί μια μετάβαση από μια κατάσταση χαμηλότερης ενέργειας σε μια κατάσταση υψηλότερης ενέργειας μέσα στο σύστημα²⁴⁰.

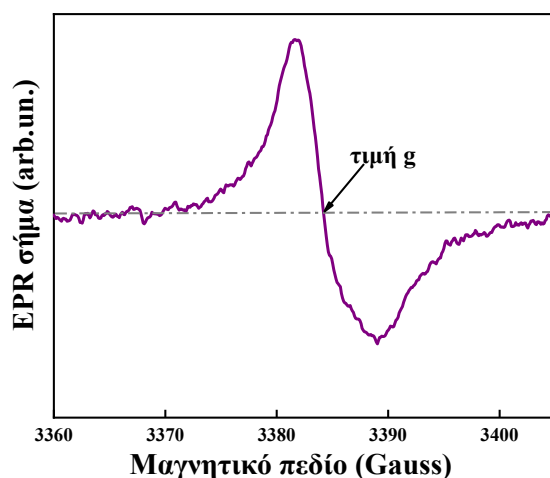
Ακόμη και ελλείψει εξωτερικών επιδράσεων, ένα απομονωμένο ηλεκτρόνιο διαθέτει μια εγγενή στροφορμή γνωστή ως "σπιν" (S) και λόγω του ηλεκτρικού φορτίου του, η γωνιακή κίνηση ενός ηλεκτρονίου παράγει μαγνητικό πεδίο. Το ηλεκτρόνιο, εμφανίζει χαρακτηριστικά μαγνητικού διπόλου, διαθέτοντας μαγνητική ροπή (μ), λόγω του φορτίου και της στροφορμής.²⁴¹

Φαινόμενο Zeeman: Η θεμελιώδης αρχή που καθορίζει τη φασματοσκοπία EPR είναι η αλληλεπίδραση μεταξύ της μαγνητικής ροπής του σπιν του ηλεκτρονίου και ενός εξωτερικού μαγνητικού πεδίου B , ένα φαινόμενο γνωστό ως φαινόμενο Zeeman (**Εικόνα 2-3**).²³⁹



Εικόνα 2-3. Η αλληλεπίδραση μεταξύ της μαγνητικής ροπής (μ_e) του σπιν του ηλεκτρονίου και ενός εξωτερικού μαγνητικού πεδίου που συμβολίζεται ως B_0 .

Παράγοντας g: Η παράμετρος με το μεγαλύτερο ενδιαφέρον στο EPR είναι ο συντελεστής g των ηλεκτρονίων. Το πεδίο συντονισμού B παρουσιάζει άμεση αναλογικότητα προς τη συχνότητα μικροκυμάτων (ν), ενώ η παράμετρος g διατηρεί την ανεξαρτησία της από τις μεταβολές της συχνότητας. Η εγγενής τιμή του g για ένα ελεύθερο ηλεκτρόνιο στο κενό είναι μια σταθερά, που ισούται με 2.00232.²⁴² Συστήματα όπως οι οργανικές ρίζες, που φέρουν ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο εμφανίζουν τιμή g πολύ κοντά στο g του ελεύθερου ηλεκτρονίου. Στο πιο κάτω σχήμα φαίνεται το φάσμα EPR της ρίζας του γαλλικού οξέος με την τιμή του $g=2.004$ (Εικόνα 2-4).

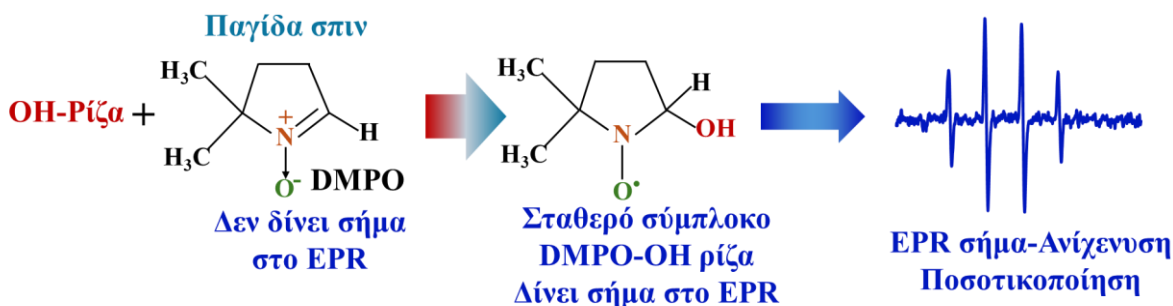


Εικόνα 2-4. EPR Φάσμα της ρίζας του γαλλικού οξέος με τιμή $g=2.004$.

Δημιουργία και ανίχνευση ριζών $\bullet\text{OH}$ με spin trapping: Μεταξύ των μυριάδων δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS), η ρίζα υδροξυλίου ξεχωρίζει ως βασικό ενδιάμεσο προϊόν. Αυτό αποδίδεται κυρίως στο σημαντικά αυξημένο τυπικό δυναμικό οξειδοαναγωγής 2.73 V σε σχέση με το αντιστρεπτό ηλεκτρόδιο οξυγόνου (Reversible Hydrogen Electrode (RHE)).²⁴³ Αυτή η μοριακή οντότητα διαθέτει εξαιρετική δραστικότητα, ικανή να προκαλέσει σημαντικές οξειδωτικές τροποποιήσεις σε αμινοξέα εντός του κυττάρου ξενιστή, προκαλώντας έτσι σημαντική βλάβη σε βιολογικά συστήματα.²⁴⁴

Ωστόσο, η ανίχνευση των $\bullet\text{OH}$ παρουσιάζει αξιοσημείωτες προκλήσεις λόγω του εξαιρετικά σύντομου χρόνου ημιζωής τους και της μεγάλης δραστικότητάς τους.^{245–247} Η φασματοσκοπία EPR λειτουργεί ως μια εξειδικευμένη αναλυτική μέθοδος²⁴⁸ προσαρμοσμένη ακριβώς για την

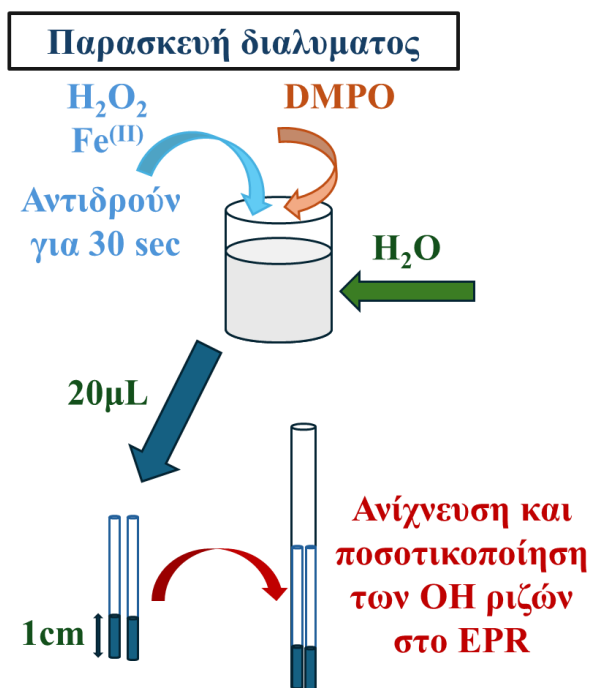
ανίχνευση και την ποσοτική ανάλυση των ελεύθερων ριζών με σχολαστική ακρίβεια.²⁴⁹ Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει χημική αλληλεπίδραση μεταξύ μιας ελεύθερης ρίζας και ενός διαμαγνητικού μορίου, που συχνά αποκαλείται παγίδα σπιν (spin trap), με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός ριζικού είδους με παρατεταμένο χρόνο ημιζωής, γνωστού ως σπιν σύμπλεγμα (spin adduct) (**Εικόνα 2-5**)^{250,251} Η τεχνική αυτή παρουσιάζει εξαιρετική ακρίβεια στην ταυτοποίηση των ελεύθερων ριζών.^{249,252} Χρησιμοποιείται το 5,5-διμεθυλο-1-πυρρολίνη Ν-οξείδιο (DMPO) συχνά ως spin trap, οδηγώντας στο σχηματισμό ενός συγκριτικά σταθερού παραμαγνητικού είδους γνωστού ως DMPO-OH^{253,254}.



Εικόνα 2-5. Η αλληλεπίδραση μεταξύ της ενεργής ελεύθερης ρίζας $\bullet\text{OH}$ και του διπλού δεσμού ενός μορίου παγίδας σπιν οδηγεί στο σχηματισμό ενός σταθερού ενδιάμεσου προϊόντος, το οποίο ανιχνεύεται μέσω φασματοσκοπίας EPR και δίνει το πιο πάνω φάσμα 1:2:2:1.

Ανίχνευση και ποσοτικοποίηση $\bullet\text{OH}$ παρουσία αντιοξειδωτικών: Για την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση των ριζών υδροξυλίου απαιτείται πρώτα η δημιουργία τους. Για την επιτυχή παραγωγή των ριζών $\bullet\text{OH}$ χρησιμοποιήθηκε η αντίδραση Fenton. Στο πλαίσιο αυτής της αντίδρασης τα ιόντα σιδήρου (Fe^{II}) αντιδρούν με το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) με αποκορύφωμα την παραγωγή $\bullet\text{OH}$ ²⁴⁵⁻²⁴⁷. Ο σίδηρος είναι το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο μέταλλο στη χημεία Fenton. Στη διαδικασία αυτή η αναγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) από ιόντα σιδήρου (Fe^{II}) παράγει ιόντα σιδήρου (Fe^{III}) και ρίζες υδροξυλίου ($\bullet\text{OH}$).

Για να ξεκινήσει η παραγωγή των ριζών $\bullet\text{OH}$, το H_2O_2 σε συγκέντρωση $C=50\mu\text{M}$ αντέδρασε με την ένωση $(\text{FeSO}_4)\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ σε συγκέντρωση $C=1\mu\text{M}$ σε τελικό όγκο 3 ml και $\text{pH}=6.7$. Ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε υπερκάθαρο νερό. Το H_2O_2 και ο $\text{Fe}^{(\text{III})}$ αφέθηκαν να αντιδράσουν για 30 sec. Οι σχηματιζόμενες ρίζες $\bullet\text{OH}$ παγιδεύτηκαν με τη χρήση 6.67mM DMPO (5,5-διμεθυλο-1-πυρρολίνη N-οξείδιο), σύμφωνα με την **Εικόνα 2-6**. Για τη μέτρηση των σημάτων EPR του παρασκευασμένου εναιωρήματος DMPO-OH, χρησιμοποιήθηκε συνολικός όγκος αντίδρασης 3ml. Στη συνέχεια 20 μL του εναιωρήματος διανεμήθηκαν σε γυάλινα τριχοειδή σωληνάκια, τα οποία τοποθετήθηκαν στην κοιλότητα του οργάνου EPR για ανάλυση(**Εικόνα 2-6**).



Εικόνα 2-6. Διαδικασία προετοιμασίας του δείγματος για την παρακολούθηση των $\bullet\text{OH}$ σε θερμοκρασία δωματίου.

Σε ότι αφορά την μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης των υβριδικών υλικών χρειάζεται κάθε φορά να παρασκευάζεται νέο διάλυμα της αντίδρασης Fenton. Αφού αντιδράσουν ο σίδηρος και το υπεροξείδιο του υδρογόνου για 30 sec όπως απεικονίζεται και πιο πάνω (**Εικόνα 2-6**), προστίθεται αμέσως μετά το εκάστοτε αντιοξειδωτικό που θέλουμε να μελετήσουμε και αφήνεται κι αυτό στο διάλυμα της Fenton, ώστε να αντιδράσει με τις $\bullet\text{OH}$ για 30 sec. Έπειτα προστίθεται το DMPO και το διάλυμα τοποθετείται σε τριχοειδή σωληνάκια για να μετρηθεί στο EPR.

Για την αξιολόγηση των αντιοξειδωτικών με φασματοσκοπία Ηλεκτρονικού Παραμαγνητικού Συντονισμού (EPR) χρησιμοποιήθηκε φασματόμετρο συνεχούς κύματος Bruker ER200D σε συνδυασμό με μετρητή συχνοτήτων Agilent 5310A για την εξακρίβωση ακριβών τιμών συχνότητας. Η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία προερχόταν από μια λυχνία (Klystron), η οποία παρείχε μικροκύματα σταθερής συχνότητας στην περιοχή της ζώνης X, συγκεκριμένα 9-10GHz. Η διάδοση των μικροκυμάτων στην κοιλότητα συντονισμού διευκολύνεται μέσω της χρήσης ενός κατάλληλου κυματοδηγού. Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων, το εκάστοτε δείγμα ήταν τοποθετημένο σε ένα σωληνάκι χαλαζία Wilmad 707-SQ-250M, το οποίο είχε 25 cm σε μήκος και 5mm διάμετρο. Τα φάσματα καταγράφηκαν υπό ελεγχόμενες συνθήκες περιβάλλοντος σε τυπική θερμοκρασία δωματίου.

Οι συνθήκες μέτρησης στο EPR ήταν οι εξής: ευαισθησία (sensitivity)= 20mV, φάση μικροκυμάτων (microwave phase)= 0 Deg, διαμόρφωση συχνότητας (modulation frequency)=100kHz, διαμόρφωση πλάτους (modulation amplitude)= 10 Gauss κορυφή σε κορυφή (Gptp), ισχύς μικροκυμάτων 20mW ενώ επαρκής λόγος σήματος προς θόρυβο επιτεύχθηκε μετά από 20 σαρώσεις. Το λογισμικό LabView, το οποίο αναπτύχθηκε στο εργαστήριο Φυσικοχημείας Υλικών και Περιβάλλοντος στο τμήμα Φυσικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, λειτούργησε ως ενδιάμεσο για την επικοινωνία και τον έλεγχο μεταξύ του μαγνητικού φασματόμετρου και του μετρητή συχνοτήτων. Επιπλέον, διευκόλυνε την απόκτηση και την αρχειοθέτηση των φασματικών δεδομένων κατά τη διάρκεια των πειραματικών διαδικασιών. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας σκόνη δείγματος αναφοράς και συγκεκριμένα το 2,2-διφαινυλο-1-πικρυλ-υδραζύλιο (DPPH[•]), το οποίο χρησιμεύει ως ένωση αναφοράς για τη σύγκριση και ακριβή εκτίμηση των συγκεντρώσεων.

Στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής η φασματοσκοπία EPR χρησιμοποιήθηκε:

1. Για το χαρακτηρισμό και τον υπολογισμό της ρίζας γαλλικού που παρατηρείται μετά την ακινητοποίηση του μονομερούς του γαλλικού οξέος στην επιφάνεια ινών του μεταξιού.
2. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ριζών OH που παράγονται μέσω της αντίδρασης Fenton, καθώς και για την ποσοτικοποίηση των ριζών OH που εξουδετερώνονται από τα υλικά που συντέθηκαν κατά τη διάρκεια της παρούσας διατριβής.

2.1.6. N₂ προσρόφηση-εκρόφηση Brunauer-Emmett-Teller (BET)

Η θεωρία Brunauer-Emmett-Teller (BET) είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος για τον προσδιορισμό της ειδικής επιφάνειας και της κατανομής του μεγέθους των πόρων των στερεών υλικών. Η ειδική επιφάνεια (SSA) ενός υλικού ορίζεται ποσοτικά ως ο λόγος της συνολικής επιφάνειας του υλικού προς τη μάζα ή τον όγκο του, παρέχοντας κρίσιμες πληροφορίες για τις ιδιότητες προσρόφησης και την αντιδραστικότητα. Οι μονάδες μέτρησης της ειδικής επιφάνειας είναι m²/g. Στη θεωρία Brunauer-Emmett-Teller (BET), οι ισόθερμες προσρόφησης περιγράφουν τον τρόπο με τον οποίο τα μόρια αερίου αλληλεπιδρούν με μια στερεή επιφάνεια. Αυτές οι ισόθερμες ταξινομούνται σε πέντε κύριους τύπους, σύμφωνα με τη Διεθνή Ένωση Καθαρής και Εφαρμοσμένης Χημείας (IUPAC). Οι καμπύλες αυτές παρέχουν πληροφορίες για τις επιφανειακές ιδιότητες, το πορώδες και τους μηχανισμούς προσρόφησης των υλικών ²⁵⁵.

Τύποι ισόθερμων καμπυλών BET

- Τύπος I: (Langmuir - Μικροπορώδη υλικά): Χαρακτηριστικό των υλικών με κατεξοχήν μικροπορώδεις δομές (πόροι < 2 nm): Η προσρόφηση πραγματοποιείται γρήγορα σε χαμηλή σχετική πίεση (P/P_0), καθώς η επιφάνεια γίνεται κορεσμένη. Ο τύπος I είναι συνήθης σε υλικά όπως ο ενεργός άνθρακας και οι ζεόλιθοι ²⁵⁶.
- Τύπος II (μη πορώδη ή μακροπορώδη υλικά - μονοστρωματική έως πολυστρωματική προσρόφηση): Ο συγκεκριμένος τύπος παρατηρείται σε μη πορώδη ή μακροπορώδη υλικά και παρουσιάζει ομαλή μετάβαση από μονοστρωματική σε πολυστρωματική προσρόφηση. Επίσης εμφανίζει ένα ευδιάκριτο σημείο καμπής όπου η μονοστρωματική κάλυψη είναι πλήρης ²⁵⁶.
- Τύπος III (ασθενής προσρόφηση - μη πορώδεις ή μακροπορώδεις επιφάνειες): Στο τύπο III φαίνονται οι ασθενείς αλληλεπιδράσεις προσροφητικού-προσροφητικού, όμως δεν υπάρχει διακριτός σχηματισμός μονοστρώματος- η προσρόφηση συνεχίζεται σταδιακά. Συχνά παρατηρείται σε υλικά όπου τα μόρια του προσροφητικού αλληλεπιδρούν περισσότερο μεταξύ τους παρά με την επιφάνεια ²⁵⁷.
- Τύπος IV (μεσοπορώδη υλικά - τριχοειδής συμπίκνωση): Χαρακτηριστικός τύπος των μεσοπορώδων υλικών (πόροι μεταξύ 2-50 nm). Παρουσιάζει αρχική προσρόφηση

μονοστρώματος-πολυστρώματος ακολουθούμενη από απότομη αύξηση λόγω τριχοειδούς συμπίκνωσης, καθώς και βρόγχο υστέρησης, υποδεικνύοντας την πλήρωση και το άδειασμα των πόρων ²⁵⁷.

- Τύπος V (Ασθενής αλληλεπίδραση με μεσοπορώδη υλικά - βρόγχος υστέρησης): Αυτός ο τύπος είναι παρόμοιος με τον τύπο III αλλά με μεσοπορώδη υλικά. Οι αλληλεπιδράσεις προσροφητικού-προσροφητικού είναι ασθενείς, οδηγώντας σε σταδιακό σχηματισμό πολλαπλών στρωμάτων. Εμφανίζεται επίσης και βρόγχος υστέρησης λόγω φαινομένων τριχοειδούς συμπίκνωσης.

Οι καμπύλες ισόθερμης BET είναι απαραίτητες για την κατανόηση του πορώδους του υλικού, των μηχανισμών προσρόφησης και της ειδικής επιφάνειας ^{256,257}.

Οι ισόθερμες προσρόφησης-εκρόφησης N₂ μετρήθηκαν στους 77 K χρησιμοποιώντας αναλυτή Quantachrome NOVAtouch LX2. Αυτή η τεχνική χαρακτηρισμού παρέχει εικόνα για την επιφάνεια και το πορώδες του υλικού. Τα δείγματα απαερώθηκαν στους 150 °C για 16 ώρες υπό κενό για να απομακρυνθούν τυχόν προσροφημένα είδη πριν από τις μετρήσεις. Η ειδική επιφάνεια (SBET) υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας τα δεδομένα προσρόφησης εντός του εύρους σχετικής πίεσης (P/P₀) 0.1–0.3, σύμφωνα με τη μέθοδο Brunauer-Emmett-Teller (BET) ²⁵⁸. Η μέθοδος Barrett-Joyner-Halenda (BJH) χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της ακτίνας πόρων, χρησιμοποιώντας τα δεδομένα προσρόφησης εντός του εύρους σχετικής πίεσης 0.35-0.99 P/P₀ ²⁵⁹. Ο συνολικός όγκος πόρων υπολογίστηκε σε σχετική πίεση 0.99 P/P₀.

2.1.7. Δυναμική Σκέδαση Φωτός (DLS) και Δυναμικό ζήτα (ZP).

Ο κατάλληλος χαρακτηρισμός των υλικών είναι ένα σημαντικό πρώτο βήμα για την περαιτέρω χρήση τους. Έτσι, ο προσδιορισμός του μεγέθους των σωματιδίων και του επιφανειακού φορτίου είναι απαραίτητος για τον κατάλληλο χαρακτηρισμό τους και η μελέτη κατανομής φορτίου μαζί με το ZP (δυναμικό ζ) είναι από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μετρήσεις για τον προσδιορισμό αυτών των χαρακτηριστικών. Και οι δύο αυτές τεχνικές έχουν προκύψει από τη φυσικοχημεία κolloειδών και με τις μετρήσεις DLS μπορούμε να αντλήσουμε πληροφορίες σχετικά με το υδροδυναμικό μέγεθος των σωματιδίων, ενώ με το δυναμικό ζ, μπορούμε να αντλήσουμε πληροφορίες σχετικά με το επιφανειακό φορτίο. Δυστυχώς, πολλές

επιπλοκές μπορεί να προκύψουν κατά τη διεξαγωγή αυτών των μετρήσεων λόγω των φυσικοχημικών ιδιοτήτων του συστήματος. Για παράδειγμα, οι διασπορές των νανοσωματιδίων σε κolloειδή συστήματα παρουσιάζουν διπλές φάσεις (dispersed and dispersant) και ενδεχομένως χρειάζονται πολύ χρόνο για να κατασταλάξουν ²⁶⁰. Οι διασπορές χαρακτηρίζονται επίσης συχνά από την κίνηση Brown των σωματιδίων ²⁶¹, και κατά τη μελέτη του επιφανειακού φορτίου, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ επιφανειών, μορίων και ιόντων οδηγούν στη δημιουργία προσροφημένων στρωμάτων ²⁶², τα οποία πρέπει να ληφθούν υπόψη.

Μελέτη Κατανομής φορτίου (DLS): Κατ' αρχήν, το φως λέιζερ έρχεται σε επαφή με το δείγμα και σκεδάζεται από τα σωματίδια. Όταν οι φάσεις του σκεδαζόμενου φωτός από κάθε σωματίδιο είναι ίδιες, η ένταση του ανιχνευόμενου σκεδαζόμενου φωτός (I) γίνεται ισχυρή. Από την άλλη πλευρά, όταν οι φάσεις είναι αντίθετες, αλληλοεξουδετερώνονται και η ένταση του σκεδαζόμενου φωτός (I) αυξομειώνεται. Μια συνάρτηση αυτοσυσχέτισης ανιχνεύει την ένταση του σκεδαζόμενου φωτός $I(t)$ ως παλμούς. Εάν η ένταση καταγράφεται με αρκετά μικρή χρονική διαφορά τ , η ένταση για δύο διαδοχικές μετρήσεις θα είναι συγκρίσιμη και έτσι θα συσχετίζεται. Η συσχέτιση της ποσότητας παλμών $I(t)$ μεταξύ ενός ορισμένου χρόνου (t) και μετά από τ δευτερόλεπτα γράφεται ως εξής (**Εξίσωση 2-1**) ²⁶³.

$$G_2(t) = \langle I(t) \times I(t + \tau) \rangle \quad \text{Εξίσωση 2-1}$$

Για τα σωματίδια, η ταχύτητα λόγω της κίνησης Brown εξαρτάται από το μέγεθος των σωματιδίων, έτσι ώστε το μέγεθος να μπορεί να υπολογιστεί από τη συνάρτηση αυτοσυσχέτισης. Τα μεγαλύτερα σωματίδια κινούνται αργά και έτσι για μεγάλους χρόνους καθυστέρησης τα συσχετισμένα σήματα παλμών μπορούν να ανιχνευθούν. Τα μικρότερα σωματίδια κινούνται ταχύτερα, οπότε, για μεγάλο χρόνο καθυστέρησης, τα παλμικά τους σήματα είναι πιο δύσκολο να συσχετιστούν ²⁶³.

Ζ δυναμικό: Για τη μέτρηση του δυναμικού ζήτη, το φως λέιζερ χωρίζεται σε δύο δέσμες φωτός εισόδου και φωτός αναφοράς. Το σκεδαζόμενο φως από τα σωματίδια του δείγματος και το φως αναφοράς επεξεργάζονται από έναν διαμορφωτή. Στη συνέχεια, αλληλεπιδρούν σε ένα πρίσμα και ανιχνεύονται. Τα ανιχνευμένα σήματα μετατρέπονται σε ψηφιακά σήματα για να υπολογιστούν.

Το επιφανειακό δυναμικό από την πραγματική επιφάνεια του σωματιδίου έως τον όγκο χωρίζεται σε διαφορετικές περιοχές που ονομάζονται ηλεκτρικό διπλό στρώμα. Το επιφανειακό δυναμικό στο όριο των δύο αυτών περιοχών, το λεγόμενο επίπεδο διάτμησης, είναι το δυναμικό ζήτα και εξαρτάται από τη σταθερότητα της κolloειδούς διασποράς²⁶³.

Ο πιο άμεσος τρόπος μέτρησης του δυναμικού ζ (ZP) είναι η μέτρηση ηλεκτροφορητικής σκέδασης φωτός (ELS), η οποία περιλαμβάνει την εφαρμογή εναλλακτικού δυναμικού στο διάλυμα. Με τον τρόπο αυτό, προκαλείται μια ταλαντευόμενη κίνηση στα σωματίδια και η συχνότητα του φωτός που σκεδάζουν (ν_0) μετατοπίζεται στη συνέχεια σε σύγκριση με τη θεμελιώδη δέσμη. Αυτό είναι το γνωστό φαινόμενο Doppler. Από τη μετρούμενη μεταβολή της συχνότητας ($\Delta\nu$) μετράται το ηλεκτρικό φορτίο των σωματιδίων. Οι θεμελιώδεις εξισώσεις που επιτρέπουν αυτή τη μέτρηση είναι οι ακόλουθες (**Εξίσωση 2-2**, **Εξίσωση 2-3**)²⁶³:

$$\text{Κινητικότητα σωματιδίων, } U = \frac{\lambda \Delta\nu}{2 \cdot E \cdot n \cdot \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)} \quad \text{Εξίσωση 2-2}$$

$$\text{Δυναμικό ζήτα, } \zeta = \frac{U \cdot \eta}{\varepsilon \cdot f(kr)} \quad \text{Εξίσωση 2-3}$$

Όπου E είναι η τάση, n ο δείκτης διάθλασης, ε η διηλεκτρική σταθερά, η το ιξώδες και f(kr) ο συντελεστής Henry.

Το κύριο όργανο που χρησιμοποιήσαμε για τα πειράματα DLS και ZP είναι το Horiba Nano Particle Analyzer SZ-100V2, το οποίο είναι εξοπλισμένο με δίοδο λέιζερ ισχύος 10mW και μήκους κύματος 532 nm. Το μέγεθος των σωματιδίων, το μετράει με τη μέθοδο συσχέτισης φωτονίων στο εύρος από 0.3 nm έως 10 μm και για το ZP μπορεί να μετρήσει από -500mV έως 500mV. Για τη μέτρηση του ZP χρησιμοποιήσαμε το όργανο σε συνδυασμό με τον ελεγκτή pH της Horiba LY-711, ο οποίος μπορεί να ρυθμίσει την τιμή του pH και τη συγκέντρωση του διαλύματος δείγματος σε μια καθορισμένη τιμή. Η αυτόματη μέτρηση του ZP ενός δείγματος σε μια καθορισμένη τιμή pH είναι διαθέσιμη με τη χρήση μιας μονάδας περισταλτικής αντλίας, η οποία κυκλοφορεί το δείγμα στην κυψελίδα ροής του αναλυτή NP. Με αυτόν τον τρόπο, μπορούμε να διεξάγουμε μετρήσεις ZP κατά την τιτλοδότηση του δείγματός μας (υδατικό διάλυμα) σε διαφορετικές περιοχές pH. Για τις τιτλοδοτήσεις χρησιμοποιήσαμε 0.1M HNO₃ και 0.1M NaOH.

3. Κεφάλαιο: Αποτελέσματα

**Πρώτο Μέρος : Υβριδικά υλικά SFd@GLA,
SFd@GLAM, GLAM@SFd@GLAM και
SFd@GA**

3.1. Σύνθεση και χαρακτηρισμός των υβριδικών υλικών με βάση το μετάξι: SFd@GLA, SFd@GLAM, το διπλά ακινητοποιημένο GLA@SFd@GLA και SFd@GA

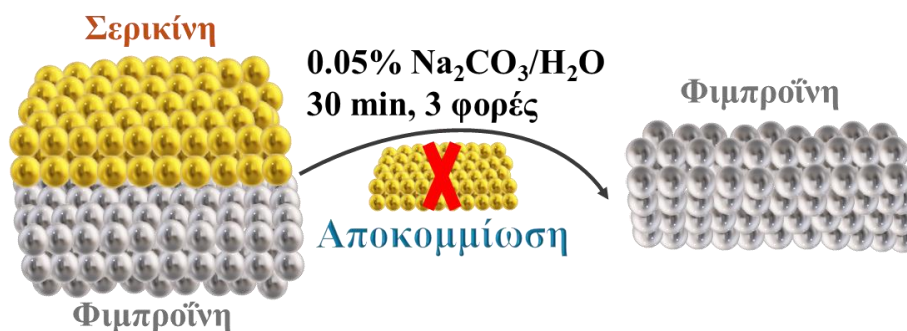
3.1.1. Εισαγωγή

Στην ενότητα αυτή θα περιγράψουμε αναλυτικά την πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε για τη σύνθεση και τον χαρακτηρισμό των υβριδικών υλικών SFd@GLA, SFd@GLAM, του διπλά εμβολιασμένου υβριδικού υλικού GLA@SFd@GLAM και του υβριδικού υλικού SFd@GA. Ξέροντας ότι τόσο το υαλουρονικό οξύ όσο και το γαλλικό οξύ θεωρούνται από τα καλύτερα φυσικά αντιοξειδωτικά και ότι το μετάξι θεωρείται ως βασίλισσα των υφασμάτων αποφασίσαμε να τροποποιήσουμε την επιφάνεια του μεταξιού με τα μονομερή του υαλουρονικού οξέος, το D-Γλυκουρονικό οξύ και την N-Ακετυλ-D-Γλυκοζαμίνη καθώς και με το γαλλικό οξύ. Η σύνθεση όλων των υβριδικών υλικών πραγματοποιήθηκε με ομοιοπολική επιφανειακή τροποποίηση μέσω της συνθετικής πορείας τύπου sol-gel. Αυτό περιλαμβάνει τη χρήση πρόδρομων σιλανίων, (3-αμινοπροπυλο)-τριαιθοξυσιλάνιο και (3-χλωροπροπυλ)-τριμεθοξυσιλάνιο, τα οποία αντιδρούν με την επιφάνεια του αποκομμιωμένου μεταξιού και τις λειτουργικές ομάδες των GLA GLAM και GA, προς σχηματισμό ενδιάμεσων πρόδρομων σιλανίων. Η υδρόλυση και η επακόλουθη συμπίκνωση των αλκοξυ-ομάδων των ενδιάμεσων πρόδρομων σιλανίων στην επιφάνεια του SFd οδηγεί στο σχηματισμό των υβριδικών υλικών SFd@GLA, SFd@GLAM και SFd@GA. Κατά τη σύνθεση του διπλά εμβολιασμένου υβριδικού υλικού, τόσο το D-Γλυκουρονικό οξύ (GLA) όσο και η N-ακετυλ-D-γλυκοζαμίνη (GLAM) συν-εμβολιάζονται στην επιφάνεια του SFd σε μοριακή αναλογία [GLA:GLAM] [2:1]. Για τον χαρακτηρισμό όλων των υβριδικών υλικών χρησιμοποιήθηκαν οι φασματοσκοπίες FT-IR, Raman, EPR, καθώς και το TG-DTA και SEM.

3.1.2. Διαδικασία αποκομμίωσης: μια επεξεργασία για την απομάκρυνση της σερικίνης από το μεταξωτό ύφασμα.

Η διεργασία της αποκομμίωσης πραγματοποιείται ώστε να αφαιρεθεί η σερικίνη και τυχόν άλλες ακαθαρσίες που μπορεί να περιέχονται στο ακατέργαστο μετάξι, ώστε να γίνει πιο μαλακό και πιο εύκαμπτο. Κατά τη διάρκεια της διεργασίας αποκομμίωσης τα κομμάτια μεταξιού κατεργάζονται με διάλυμα ανθρακικού νατρίου (Na_2CO_3) και νερού. Για να επιτευχθεί η αποκομμίωση, τρία μικρά κομμάτια μεταξιού, το καθένα βάρους περίπου 15 mg, βυθίζονται σε υδατικό διάλυμα 0.05% Na_2CO_3 όγκου 100 ml. Στη συνέχεια, το σύνολο του εναιωρήματος υποβάλλεται σε αναρροή με θέρμανση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία 90 °C. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται άλλες δύο φορές, κάθε φορά με καινούριο διάλυμα Na_2CO_3 για την πλήρη αφαίρεση της σερικίνης και ακολούθως τα τρία κομμάτια πανιού τοποθετούνται σε ύαλο ωρολογίου για 1 λεπτό. Στην συνέχεια τοποθετούνται σε ποτήρι ζέσεως το οποίο περιέχει περίπου 10 ml απιονισμένο νερό και αναδεύονται για 5 λεπτά. Αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται άλλες δύο φορές ώστε από τα δείγματα του μεταξιού να αφαιρεθούν τα άλατα. Έπειτα τοποθετούνται πάλι σε ύαλο ωρολογίου και αφήνονται να στεγνώσουν για 5 λεπτά. Τέλος, ξηραίνονται στον αέρα με τη χρήση συσκευής Dry-Pistol για 24 ώρες σε ελεγχόμενη θερμοκρασία 40 °C (Εικόνα 3-1)

202

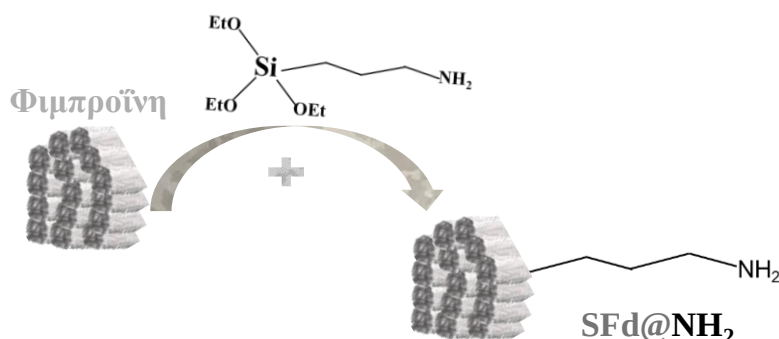


Εικόνα 3-1. Σχηματική αναπαράσταση πορείας αποκομμίωσης.

3.1.3. Σύνθεση του υβριδικού υλικού SFd@GLA: Επιφανειακή τροποποίηση της επιφάνειας του αποκομιωμένου μεταξιού (SFd) με το μονομερές του γλουκουρονικού οξέος.

3.1.3.1. Η πρόδρομη ουσία με αμινο-τελικό άκρο υφίσταται αντίδραση με την αποκομιωμένη μεταξωτή ίνα (SFd), με αποτέλεσμα το σχηματισμό του υλικού SFd@NH₂.

Δύο δείγματα αποκομιωμένου μεταξωτού υφάσματος (SFd) το οποίο περιέχει μόνο την φιβροΐνη βυθίζονται σε 10 ml αιθανόλης για 24 ώρες. Στη συνέχεια, τα δείγματα SFd μεταφέρονται σε διάλυμα αποτελούμενο από 10 ml μεθανόλης και 0.044 mmol (3-αμινοπροπυλο)τριαθοξυσιλάνιο, μαζί με 5 ml καθαρής αιθανόλης. Το μίγμα αναδεύεται υπό αναρροή με θέρμανση, σε θερμοκρασία 60 °C για 24 ώρες. Στη συνέχεια, το υλικό SFd@NH₂ πλένεται με μεθανόλη, αιθανόλη και διαιθυλαιθέρα με φυγοκέντριση στις 6000 στροφές ανά λεπτό χρησιμοποιώντας φυγόκεντρο ROTINA Hettich για 7 λεπτά. Μετά τη φυγοκέντριση, το υλικό ξηραίνεται στον αέρα για 24 ώρες^{87,202} (**Εικόνα 3-2**).

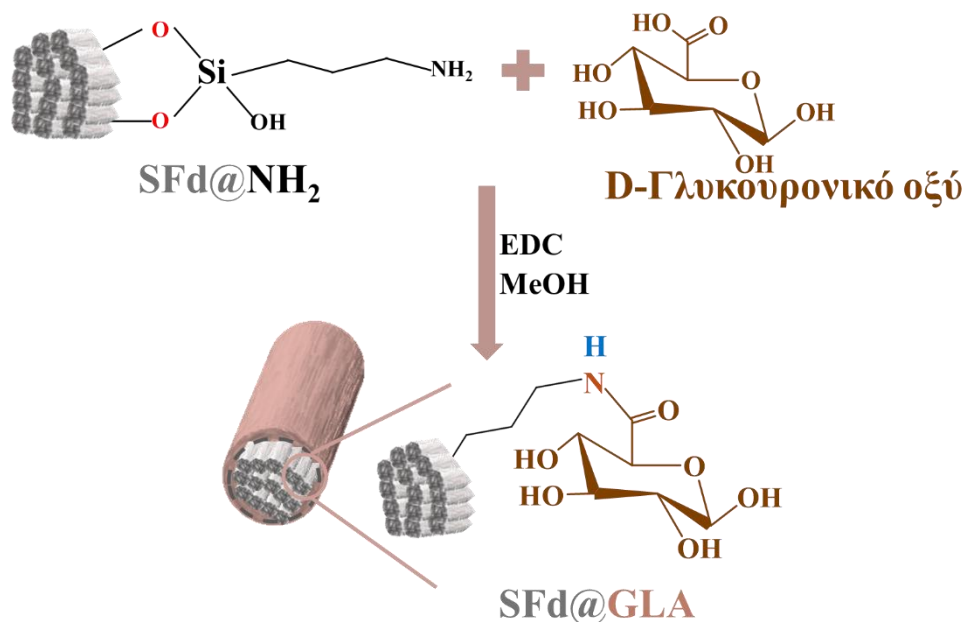


Εικόνα 3-2. Συνθετική τροποποίηση της επιφάνειας των μεταξωτών ινών που περιλαμβάνει την εισαγωγή τερματικών αμινομάδων για τη βελτίωση των λειτουργικών ιδιοτήτων τους.

3.1.3.2. Ακινητοποίηση του D-Γλουκουρονικού οξέος στην επιφάνεια των αποκομιωμένων ινών SFd

Παρασκευάζεται διάλυμα που περιέχει 7.4 mg (0.038 mmol) D-γλουκουρονικού οξέος και 2.5 mg (0.016 mmol) EDC (υδροχλωρικό N-(3-(διμεθυλαμινο)προπυλο)-N'-αιθυλοκαρβοδιιμίδιο)

σε 10 ml μεθανόλης. Στη συνέχεια, το διάλυμα υποβάλλεται σε επεξεργασία υπερήχων για την επίτευξη ομοιογενούς εναιωρήματος, εξασφαλίζοντας την πλήρη διάλυση και ανάμιξη των αντιδρώντων. Πριν από την προσθήκη του στο προαναφερθέν διάλυμα, το υλικό SFd@NH₂ (30 mg) εμβαπτίζεται σε 10 ml αιθανόλης για 24 ώρες, ώστε να εξασφαλιστεί η πλήρης διαλυτοποίηση και ενεργοποίηση των επιφανειακών αμινομάδων. Ακολούθως, το εμποτισμένο SFd@NH₂ εισάγεται στο διάλυμα μεθανόλης, προστίθενται άλλα 5 ml καθαρής αιθανόλης και το μείγμα υφίσταται αναρροή με θέρμανση στους 60 °C για 24 ώρες. Αυτή η διαδικασία αναρροής διευκολύνει την αντίδραση μεταξύ του αμινο-λειτουργικού SFd και του D-γλυκουρονικού οξέος, με τη μεσολάβηση του αντιδραστήριου σύζευξης EDC (**Εικόνα 3-3**). Ακολούθως, το προκύπτον προϊόν SFd@GLA υποβάλλεται σε διεξοδική έκπλυση που περιλαμβάνει μεθανόλη, αιθανόλη και διαιθυλαιθέρα για την απομάκρυνση τυχόν μη αντιδρώντων ουσιών και παραπροϊόντων. Το στερεό SFd@GLA απομονώνεται με φυγοκέντριση στις 6000 στροφές ανά λεπτό με φυγόκεντρο ROTINA Hettich για 7 λεπτά, ώστε να διασφαλιστεί ο αποτελεσματικός καθαρισμός του στερεού προϊόντος. Τέλος, το υλικό αφήνεται να στεγνώσει στον αέρα για 24 ώρες για την απομάκρυνση τυχόν υπολειμμάτων διαλυτών, αποδίδοντας το τελικό προϊόν SFd@GLA σε καθαρισμένη και ξηρή μορφή^{87,202}.



Εικόνα 3-3. Συνθετική πορεία για την ακινητοποίηση του γλυκουρονικού οξέος (GLA) στην επιφάνεια του SFd@NH₂, που οδηγεί στο σχηματισμό του υβριδικού υλικού SFd@GLA.

3.1.4. Χαρακτηρισμός του υβριδικού υλικού SFd@GLA

3.1.4.1. Θερμοσταθμική Διαφορική Θερμική Ανάλυση (TG-DTA)

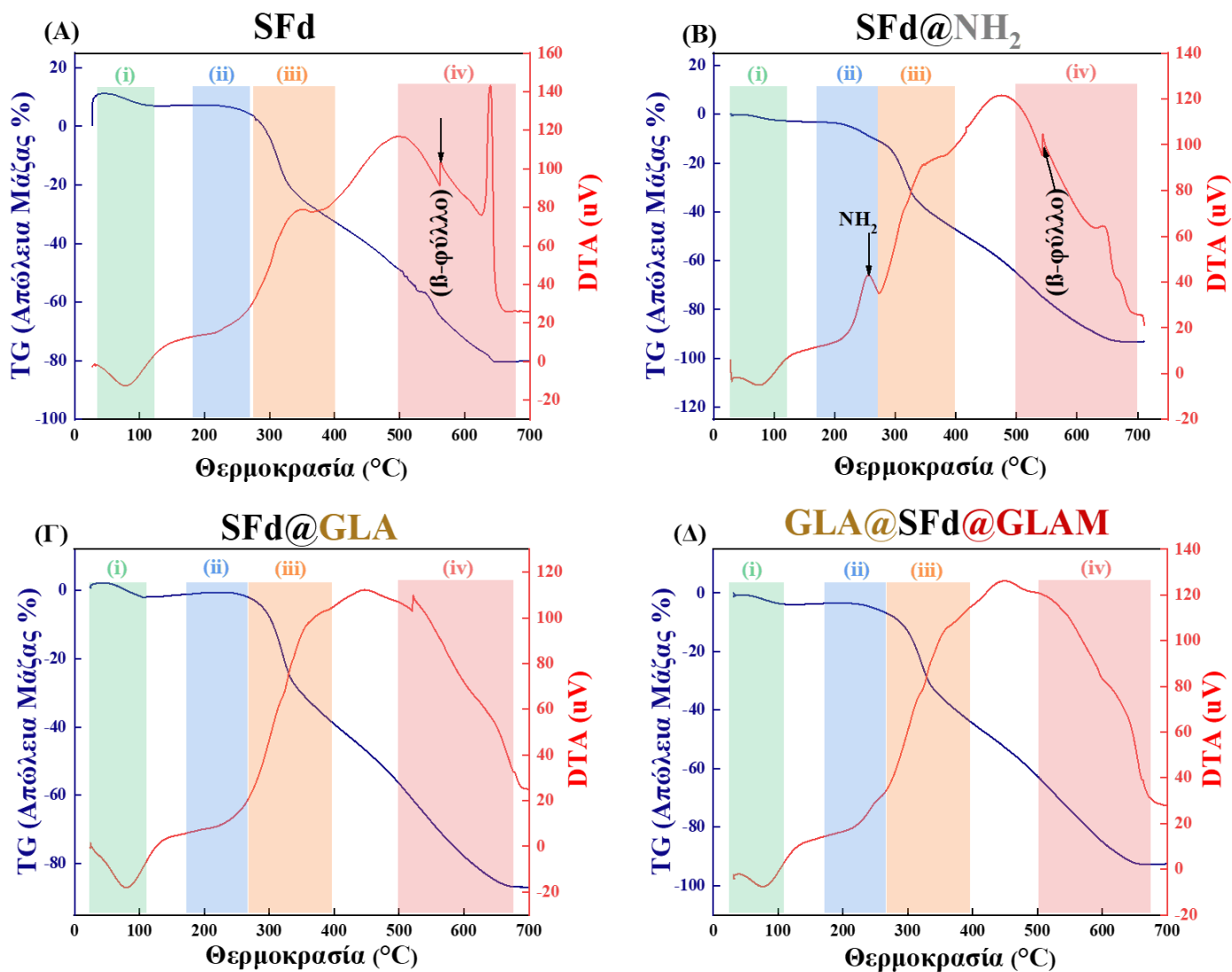
Το οργανικό φορτίο όλων των τροποποιημένων υλικών αξιολογήθηκε ποσοτικά με τη χρήση ενός οργάνου TG-DTA (θερμοβαρυμετρική-διαφορική θερμική ανάλυση) της Setaram. Για την αξιολόγηση των μεταξωτών υφασμάτων χρησιμοποιήθηκαν περίπου 10 έως 11 mg από κάθε δείγμα. Η θερμική ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε ένα εύρος θερμοκρασιών από 20 °C έως 700 °C, χρησιμοποιώντας σταθερό ρυθμό θέρμανσης 10 °C/min, υπό ελεγχόμενη ροή συνθετικού αέρα. Η μέθοδος αυτή επέτρεψε τον ακριβή προσδιορισμό των χαρακτηριστικών γραμμών θερμικής αποικοδόμησης των τροποποιημένων υλικών, παρέχοντας πληροφορίες σχετικά με την αποτελεσματικότητα της διαδικασίας ακινητοποίησης του γλουκουρονικού οξέος στην επιφάνεια του αποκομμιωμένου μεταξιού (SFd). Πιο κάτω φαίνονται τα δεδομένα της θερμοσταθμικής διαφορικής θερμικής ανάλυσης (TG-DTA) για 4 υλικά: SF, SFd αποκομμιωμένο μετάξι, SFd@NH₂ και SFd@GLA. Οι τεχνικές θερμοβαρυμετρικής (TG) και διαφορικής θερμικής ανάλυσης (DTA) χρησιμοποιήθηκαν ταυτόχρονα σε μια μοναδική πειραματική διάταξη, διευκολύνοντας τις ταυτόχρονες μετρήσεις ²³⁵. Στα θερμογραφήματα που παρουσιάζονται παρακάτω, η κόκκινη γραμμή περιγράφει τις εξώθερμες και ενδόθερμες μεταβάσεις που παρατηρούνται στο θερμογράφημα (DTA), ενώ η μπλε γραμμή αναπαριστά το αθροιστικό προφίλ απώλειας μάζας του υπό εξέταση υλικού (TG).

Στην **Εικόνα 3-4A**, η καμπύλη TG για το ακατέργαστο μετάξι (SF) (φαίνεται με μπλε γραμμή) απεικονίζει μια προοδευτική μείωση της μάζας που αποδίδεται στη διεργασία καύσης του μεταξιού. Ταυτόχρονα, η καμπύλη DTA (υποδεικνύεται από την κόκκινη γραμμή) απεικονίζει διακριτές εξώθερμες και ενδόθερμες κορυφές. Η μείωση της μάζας που παρατηρείται κάτω από T<110 °C μπορεί να αποδοθεί στην εκρόφηση της απορροφημένης υγρασίας. Οι πτητικές ενώσεις με χαμηλότερα σημεία βρασμού εξατμίζονται εντός του εύρους θερμοκρασιών 170 °C έως 275 °C, ενώ η διάσπαση των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων λαμβάνει χώρα μεταξύ 275 °C έως 400 °C. Σε αυξημένες θερμοκρασίες, λαμβάνει χώρα μερική διάσπαση των πεπτιδικών δεσμών εντός των μεταξωτών ινών, ωστόσο η συνολική αποικοδόμηση των πρωτεϊνών του μεταξιού συντελείται σε θερμοκρασίες που υπερβαίνουν τους T >500 °C ²⁰².

Στην **Εικόνα 3-4 Β** παρουσιάζεται το θερμογράφημα που λαμβάνεται για το υλικό SFd. Η παρατηρούμενη μείωση του βάρους κάτω από τους 110 °C αποδίδεται στη διαδικασία της εκρόφησης, η οποία χαρακτηρίζεται κυρίως από την εξάτμιση των προσροφημένων μορίων νερού από το υλικό. Όπως απεικονίζεται στην **Εικόνα 3-4 Β**, εντός του εύρους θερμοκρασιών 170 έως 275 °C, παρατηρείται μικρή έκλυση πτητικών συστατικών χαμηλής θερμοκρασίας. Αντίθετα, εντός του εύρους θερμοκρασιών 275 έως 400 °C, παρατηρείται διάσπαση πλευρικών ομάδων από την αλυσίδα των αμινοξέων. Επιπλέον, το πιο κάτω φάσμα παρουσιάζει μια ευδιάκριτη κορυφή στους 577 °C, η οποία αποδίδεται στην αποικοδόμηση των β-φύλλων²⁰². Αξίζει να σημειωθεί ότι η $T_{\max}$, στους 577 °C σηματοδοτεί την πλήρη καύση του SFd και είναι χαμηλότερη σε σύγκριση με την αντίστοιχη $T_{\max}$ των 600°C για το SF. Η διαφορά αυτή υποδηλώνει την προστατευτική λειτουργία που ασκεί η σερίκίνη στο ακατέργαστο ύφασμα μεταξιού-SF.

Η **Εικόνα 3-4 Γ** απεικονίζει το θερμογράφημα που αντιστοιχεί στο υλικό SFd@NH₂. Ειδικότερα, εμφανίζεται μια ευδιάκριτη εξώθερμη κορυφή στην περιοχή 250-300 °C, η οποία αποδίδεται στη διαδικασία αποικοδόμησης που περιλαμβάνει τις λειτουργικές τερματικές αμινομάδες που υπάρχουν στο υλικό SFd@NH₂. Το αθροιστικό ποσοστό απώλειας μάζας που παρατηρήθηκε για το SFd@NH₂ εντός του εύρους θερμοκρασιών 200-400 °C αντιστοιχεί κυρίως στην αποσύνθεση των πλευρικών αλυσίδων αμινοξέων μαζί με τις εμβολιασμένες λειτουργικές ομάδες προπυλο-αμίνης και το οποίο αντιστοιχεί συνολικά σε 43.8%. Λαμβάνοντας υπόψη ότι το συνολικό ποσοστό απώλειας μάζας που παρουσιάζει το SFd εντός του εύρους 200-400 °C είναι 39.6%, το υπόλοιπο 4.3% αποδίδεται στις ομάδες H₂N(CH₂)₃- και ισοδυναμεί με 0.73 mmol εμβολιασμένων αμινομάδων ανά γραμμάριο SFd@NH₂.

Η απώλεια μάζας που αποδίδεται στο SFd@GLA στην ίδια περιοχή θερμοκρασιών (**Εικόνα 3-4 Δ**) ανέρχεται σε 51%. Αφαιρώντας το 4.3% που συνεισφέρει το SFd@NH₂, προκύπτει ένα υπόλοιπο 7.2% που προέρχεται από την καύση του γλουκουρονικού οξέος. Αυτό αντιστοιχεί σε περίπου 0.29 mmol εμβολιασμένου GLA ανά γραμμάριο SFd@GLA.



Εικόνα 3-4. Η θερμοβαρυνμετρική (TG) και η διαφορική θερμική ανάλυση (DTA) πραγματοποιήθηκαν για (Α) το ακατέργαστο μετάξι , (Β) το αποκομιμωμένο μεταξωτό ύφασμα SFd, (Γ) SFd@NH₂ και (Δ) SFd@GLA. Τα αντίστοιχα πεδία (i), (ii), (iii) και (iv) απεικονίζουν διακριτά θερμικά γεγονότα: (i) εξάτμιση του προσροφημένου νερού, (ii) απομάκρυνση πτητικών ειδών χαμηλής θερμοκρασίας, (iii) διάσπαση πλευρικών αλυσίδων αμινοξέων και ακινητοποιημένων ομάδων, και (iv) πλήρης αποικοδόμηση των πρωτεϊνών μεταξιού.

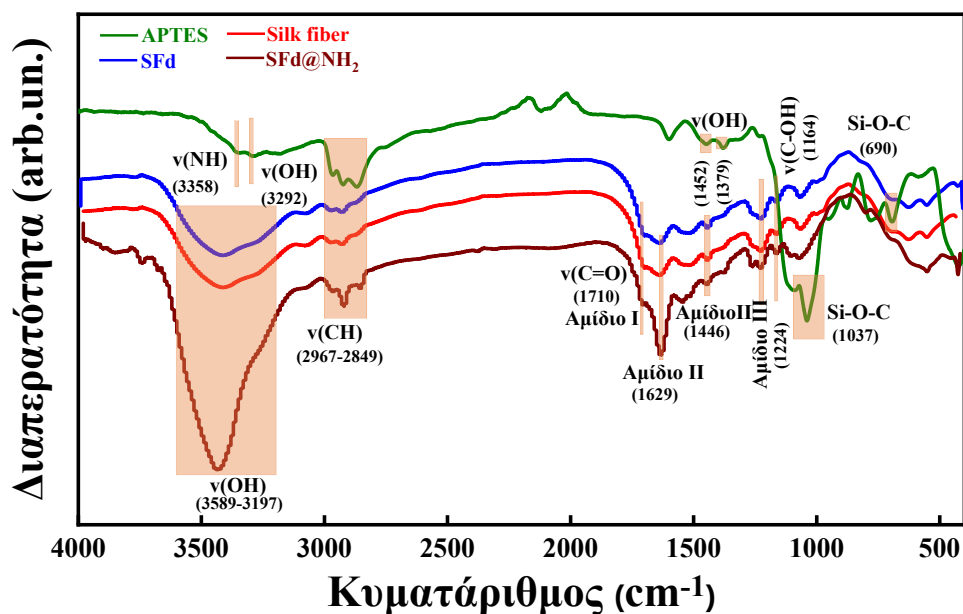
3.1.4.2. Φασματοσκοπία FT-IR

Οι μετρήσεις FT-IR πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση φασματοφωτομέτρου FT-IR Nicolet™ IS-5™, με δείγματα που παρασκευάστηκαν ως δισκία KBr. Οι ίνες που προέρχονταν από διάφορα υφάσματα αναμείχθηκαν με βρωμιούχο κάλιο (KBr) και υποβλήθηκαν σε μονοαξονική συμπίεση (10N) με τη χρήση υδραυλικής πρέσας. Η διαδικασία αυτή είχε ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό συμπιεσμένων δισκίων με ομοιόμορφη διάμετρο 1 cm και μεταβλητό πάχος που κυμαίνεται από 1 έως 15 mm. Τα τελικά φάσματα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο 32 μεμονωμένων φασμάτων, που αποκτήθηκαν εντός της φασματικής περιοχής 400 έως 4000 cm^{-1} , με φασματική ανάλυση 2 cm^{-1} .

Τα φάσματα υπερύθρου (IR) που καλύπτουν την περιοχή 4000-400 cm^{-1} για όλα τα υλικά απεικονίζονται στις **Εικόνα 3-5** και **Εικόνα 3-6**. Στην περίπτωση του μη επεξεργασμένου μεταξιού (**Εικόνα 3-5**), η παρουσία μιας ευρείας ταινίας με κέντρο τα 3417 cm^{-1} αντιστοιχεί στις δονήσεις τάσης που σχετίζονται με τους δεσμούς ν(OH). Οι κορυφές που παρατηρήθηκαν στα 2967, 2921 και 2849 cm^{-1} αποδίδονται στις δονήσεις τάσης των δεσμών ν(C-H) που είναι εγγενείς στο μετάξι. Επιπλέον, η ταινία που καταγράφεται στα 1705 cm^{-1} αποδίδεται στους τρόπους δόνησης που σχετίζονται με τους δεσμούς ν(C=O), ειδικά ενδεικτικοί των διαμορφώσεων του Αμιδίου Ι (β-φύλλο) ²⁰². Οι ταινίες που παρατηρούνται στα 1640 cm^{-1} , 1438 cm^{-1} και 1238 cm^{-1} αποδίδονται σε αμιδικούς δεσμούς, αντιπροσωπεύοντας συγκεκριμένα το Αμίδιο Ι (ν C=O), Αμίδιο ΙΙ δ (παραμόρφωση N-H) με ν(τάση C-N) και το Αμίδιο ΙΙΙ τάση C-N με δ (παραμόρφωση N-H) αντίστοιχα ²⁰². Επιπλέον, η ταινία που ανιχνεύεται στα 1169 cm^{-1} αποδίδεται στη δόνηση τάσης του δεσμού ν(C-H) ²⁰².

Στο φάσμα FT-IR του SFd αναδύεται μια σημαντική ευρεία ταινία περίπου στα 3423 cm^{-1} , που αντιστοιχεί στις ταλαντώσεις τάσης που σχετίζονται με τον δεσμό ν(OH). Είναι ενδιαφέρον ότι οι ταινίες στα 2970, 2925 και 2853 cm^{-1} , οι οποίες υποδηλώνουν δονήσεις τάσης στους δεσμούς (C-H) του μεταξιού, εμφανίζουν μικρές μετατοπίσεις από τις αρχικές τους θέσεις ως αποτέλεσμα της αφαίρεσης του πρωτεϊνικού συστατικού της σερίκίνης. Επιπλέον, παρατηρείται μια ευδιάκριτη μετατόπιση της ταινίας στα 1710 cm^{-1} σε σύγκριση με εκείνη του ακατέργαστου μεταξιού, η οποία τυπικά καταγράφεται στα 1705 cm^{-1} . Οι ταινίες που εντοπίστηκαν στα 1640 cm^{-1} , 1438 cm^{-1} και 1238 cm^{-1} είναι ενδεικτικές του σχηματισμού αμιδικών δεσμών, που αντιστοιχούν στο Αμίδιο Ι, Αμίδιο ΙΙ και Αμίδιο ΙΙΙ, αντίστοιχα. Τέλος, η εμφάνιση μιας ταινίας στα 1176 cm^{-1} υποδηλώνει

την παρουσία δονήσεων τάσης των δεσμών (C-OH)^{87,202}.



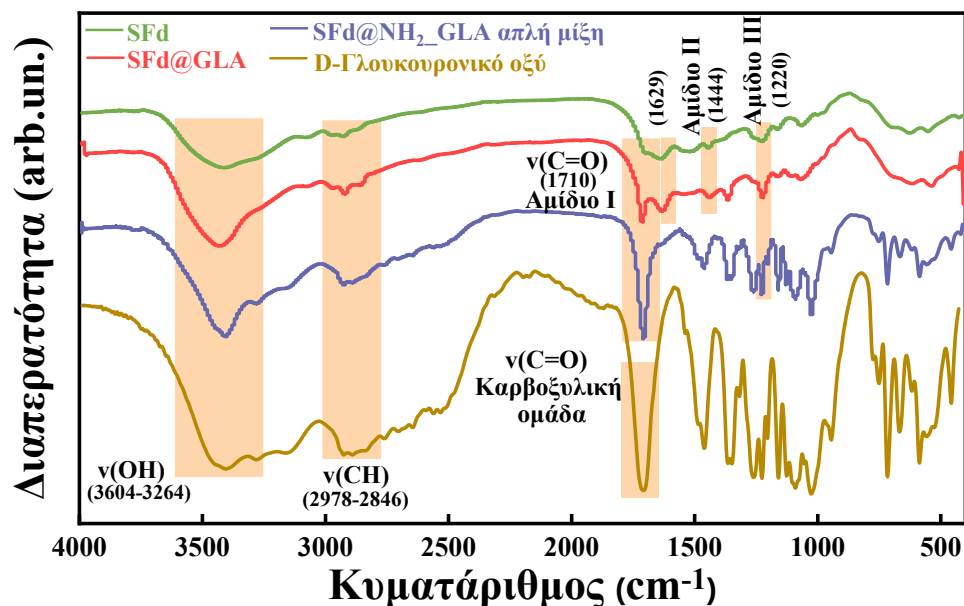
Εικόνα 3-5. Απεικονίζονται φάσματα FTIR για μη το επεξεργασμένο μεταξωτό ύφασμα (SF), SFd, SFd@NH₂ και (3 αμινοπροπυλο)τριαιθοξυσιλάνιο μεμονωμένα.

Πριν από την ανάλυση του φάσματος FTIR του τροποποιημένου υφάσματος SFd@NH₂, λήφθηκε το φάσμα της αμινο πρόδρομης ουσίας (3-αμινοπροπυλο)τριαιθοξυσιλάνιο (**Εικόνα 3-5**). Το φάσμα αυτό διακρίνεται από μια ευδιάκριτη ταινία στα 3358 cm⁻¹, που υποδηλώνει δονήσεις τάσης (N-H). Επιπλέον, οι ταινίες που παρατηρούνται στην περιοχή των 3392 cm⁻¹, 1452 cm⁻¹ και 1379 cm⁻¹ αποδίδονται σε δονήσεις τάσης του δεσμού (OH). Επιπρόσθετα, οι ταινίες που ανιχνεύονται στα 1125 cm⁻¹, 1059 cm⁻¹ και 697 cm⁻¹ αποδίδονται σε δονήσεις τάσης του δεσμού (Si-O-C)^{87,202}. Στη συνέχεια, στο φάσμα FT-IR του SFd@NH₂ (καφέ φάσμα), μια διακριτή πεπλατυσμένη ταινία είναι εμφανής στα 3456 cm⁻¹, ενδεικτική των δονήσεων που προκαλούνται εντός του δεσμού (OH) (**Εικόνα 3-5**). Επιπλέον, οι ταινίες που παρατηρούνται στα 3062 cm⁻¹, 2978 cm⁻¹ και 2911 cm⁻¹, οι οποίες σχετίζονται με τις χαρακτηριστικές δονήσεις τάσης του δεσμού (C-H), παρουσιάζουν μικρές αποκλίσεις σε σύγκριση με εκείνες που παρατηρούνται στο (3-αμινοπροπυλο)τριαιθοξυσιλάνιο και το SFd. Είναι αξιοσημείωτο ότι είναι εμφανείς οι τρεις διακριτές ταινίες που αντιστοιχούν σε αμιδικούς δεσμούς στα 1640 cm⁻¹, 1438 cm⁻¹ και 1238 cm⁻¹.

¹ (που αντιπροσωπεύουν το Αμίδιο I, II και III, αντίστοιχα). Επιπλέον, η ταινία που παρατηρείται στα 700 cm⁻¹, η οποία αποδίδεται στον δεσμό (Si-O-C) ^{87,202}, υποδηλώνει την αποτελεσματική τροποποίηση της μεταξωτής ίνας με λειτουργικές ομάδες που περιέχουν Si.

Στην **Εικόνα 3-6** απεικονίζονται τα φάσματα FTIR του υβριδικού υλικού, SFd@GLA, σε αντιπαράθεση με το αποκομμιωμένο μεταξωτό ύφασμα (SFd), το ακατέργαστο μετάξι (SF) καθώς και το ελεύθερο μόριο του D-γλουκουρονικού οξέος για σύγκριση. Το φάσμα FT-IR για το ακατέργαστο μετάξι έχει αναλυθεί λεπτομερώς πιο πάνω, όπως και το φάσμα του αποκομμιωμένου μεταξιού (SFd). Στην **Εικόνα 3-6** με την ανοιχτή πράσινη γραμμή απεικονίζεται το φάσμα FT-IR του μονοσακχαρίτη D-Γλυκουρονικό οξύ. Οι φασματικές ταινίες που παρατηρούνται στα 3407, 3280 και 3160 cm⁻¹ αποδίδονται στην παρουσία ομάδων υδροξυλίου (OH) εντός του γλουκουρονικού οξέος ²⁶⁴. Οι ταινίες που παρατηρούνται στα 2895 και 2931 cm⁻¹ αποδίδονται στις δονήσεις ν(CH₂). Επιπλέον, η κορυφή που παρατηρείται στα 1707 cm⁻¹ προέρχεται από τις δονήσεις κάμψης του δεσμού δ(C=O) ^{87,264}. Οι ταινίες που ανιχνεύονται στα 1460, 1358, 1263 και 1224 cm⁻¹ προέρχονται από τις δονήσεις ν(CH₂). Τέλος, η ταινία στα 1163 cm⁻¹ αποδίδεται στην παρουσία της ομάδας C-O.

Στην **Εικόνα 3-6** με την κόκκινη γραμμή απεικονίζεται το φάσμα για το υβριδικό υλικό SFd@GLA και εκεί μια πεπλατυσμένη ταινία στα 3435 cm⁻¹, υποδεικνύει την παρουσία δονήσεων (O-H) τάσης. Επιπλέον, οι κορυφές που παρατηρούνται στα 2978, 2927 και 2850 cm⁻¹ αποδίδονται σε δονήσεις τάσης που προέρχονται από το γεφυρωτικό τμήμα της (CH₂). Η ταινία στα 1710 cm⁻¹ εμφανίζεται λόγω της παρουσίας του δεσμού ν (C=O). Οι κορυφές στα 1628, 1443, 1230 cm⁻¹ αποδίδονται στην ύπαρξη αμιδικών δεσμών, Αμιδίου I, II και III αντίστοιχα, όπως και στο φάσμα του SFd. Τέλος, η ταινία στα 1156 cm⁻¹ εμφανίζεται λόγω της ύπαρξης της δόνησης του δεσμού ν(C-O) ²⁶⁵.



Εικόνα 3-6. Απεικόνιση των φασμάτων FT-IR για το αποκομμιωμένο μετάξι (SFd) (ανοιχτή πράσινη γραμμή), το υβριδικό υλικό SFd@GLA (κόκκινη γραμμή), του μίγματος που προήλθε από απλή ανάμιξη υλικών SFd@NH₂_GLA (μπλε γραμμή) και του μονομερούς του D-Γλουκουρονικού οξέος (GLA) (ανοιχτή καφέ γραμμή).

Τέλος στην **Εικόνα 3-6** απεικονίζεται το φάσμα FT-IR του μίγματος που προήλθε από την απλή ανάμιξη του υλικού SFd@NH₂ και GLA. Αυτό το φάσμα φαίνεται να μοιάζει πιο πολύ στο φάσμα του ελεύθερου γλουκουρονικού οξέος παρά του ακινητοποιημένου SFd@GLA, αναδεικνύοντας ότι το τελευταίο είναι μονοφασικό υλικό. Οι φασματικές ταινίες που παρατηρήθηκαν στα 3407 cm⁻¹, 3280 cm⁻¹ και 3160 cm⁻¹ αποδίδονται σε δονήσεις τάσης των ομάδων υδροξυλίου (OH) εντός του γλουκουρονικού οξέος²⁶⁶. Στην ύπαρξη του δεσμού και των δονήσεων ν(CH₂) οφείλονται οι ταινίες που παρατηρούνται στα 2895 και 2931 cm⁻¹. Η ταινία που εμφανίζεται στα 1710 cm⁻¹ οφείλεται τόσο στην ύπαρξη των δονήσεων κάμψης του δεσμού δ (C=O) του γλουκουρονικού οξέος^{87,266} όσο και στις δονήσεις του δεσμού ν(C=O) εντός της δομής β-φύλλου του αμιδίου I. Είναι αξιοσημείωτο ότι είναι εμφανείς και οι δύο διακριτές ταινίες που αντιστοιχούν σε αμιδικούς δεσμούς στα 1444 cm⁻¹ και 1220 cm⁻¹ (που αντιπροσωπεύουν το Αμίδιο II και το Αμίδιο III, αντίστοιχα). Επιπλέον, η ταινία που παρατηρείται στα 700 cm⁻¹, η οποία αποδίδεται στον δεσμό (Si-O-C)⁸⁷ υποδεικνύει την επιτυχή τροποποίηση της μεταξωτής ίνας με τερματικές ομάδες που φέρουν κέντρα Si²⁶⁵.

3.1.4.3. Φασματοσκοπία Raman

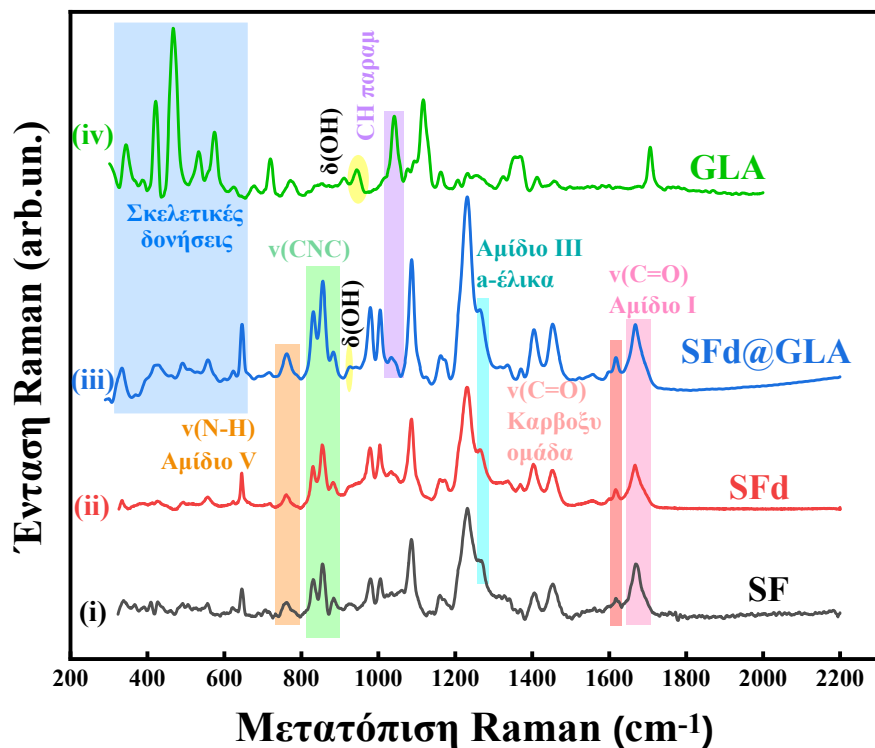
Η φασματοσκοπία Raman είναι μια εξαιρετικά ευαίσθητη αναλυτική τεχνική που χρησιμοποιείται κυρίως για την εξέταση διαφόρων δομικών συστατικών. Τα φάσματα Raman αποκτήθηκαν επί 10 δευτερόλεπτα, συσσωρεύοντας δεδομένα από 50 σαρώσεις για να εξασφαλιστεί ένας ισχυρός λόγος σήματος προς θόρυβο. Οι μετρήσεις αυτές πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση οργάνου HORIBA-Xplora Plus, το οποίο συνδυάστηκε με μικροσκόπιο Olympus BX41 και ήταν εφοδιασμένο με διοδικό λέιζερ 785 nm ως πηγή διέγερσης. Στην **Εικόνα 3-7** παρουσιάζονται τα φάσματα Raman για το μονομερές D-Γλυκουρονικό οξύ (GLA) (ανοιχτό πράσινο), το υβριδικό υλικό SFd@GLA (μπλε γραμμή), αποκομμιωμένο μετάξι (SFd) (κόκκινη γραμμή) και το ακατέργαστο μετάξι SF (μαύρη γραμμή) αντίστοιχα.

Το φάσμα Raman που φαίνεται στην **Εικόνα 3-7** (i) (μαύρη γραμμή) αντιστοιχεί στο ακατέργαστο μετάξι. Οι παρατηρούμενες κορυφές που βρίσκονται στα 1700 cm^{-1} και 1670 cm^{-1} αντιστοιχούν σε δόνησεις του δεσμού $\nu(\text{C}=\text{O})$, ενδεικτικές της παρουσίας του Αμιδίου-I. Επιπλέον, ο ώμος που διακρίνεται στα $1300\text{-}1270\text{ cm}^{-1}$ υποδηλώνει την παρουσία του Αμιδίου-III, χαρακτηριστικού δομής α -έλικας²⁶⁷. Η παρατηρούμενη κορυφή στα 1087 cm^{-1} αποδίδεται στη δόνηση $\nu(\text{CO})$ που προέρχεται από τους δεσμούς CH_2OH ²¹⁰. Επιπλέον, οι κορυφές που παρατηρούνται στην περιοχή $1008\text{-}980\text{ cm}^{-1}$ αποδίδονται σε δονήσεις των δεσμών $\nu(\text{C}-\text{C})$, ενώ εκείνες που εμφανίζονται γύρω στα $900\text{-}800\text{ cm}^{-1}$ υποδεικνύουν την παρουσία συμμετρικών δονήσεων που σχετίζονται με τον δεσμό $\nu(\text{CNC})$ ^{87,268}. Η ταινία που ανιχνεύεται στα 764 cm^{-1} αποδίδεται στο δεσμό $\nu(\text{N}-\text{H})$ του Αμιδίου V²⁶⁷.

Το φάσμα Raman του SFd απεικονίζεται στην **Εικόνα 3-7** (ii) με την κόκκινη γραμμή. Η διακριτή κορυφή που παρατηρείται στα 1695 cm^{-1} αποδίδεται σε δονήσεις των δεσμών $\nu(\text{C}=\text{O})$ που προκαλούνται από δονήσεις τάσεων και σχετίζονται ιδιαίτερα με τη διαμόρφωση του Αμιδίου-I (φύλλο β)²⁶⁷. Επιπλέον, οι καρβονυλικοί δεσμοί που προέρχονται από τον Αμιδικό δεσμό διακρίνονται στις κορυφές που παρατηρούνται στα 1615 και 1601 cm^{-1} . Επιπρόσθετα, η παρουσία του δεσμού Αμιδίου-III, χαρακτηριστικού της α -έλικας, υποδηλώνεται από τις κορυφές στην περιοχή $1300\text{-}1270\text{ cm}^{-1}$ ²⁶⁷. Τέλος, η κορυφή που διακρίνεται στα 1083 cm^{-1} αντιστοιχεί στον δεσμό CH_2OH , που αποδίδεται ακριβώς στην δόνηση του δεσμού άνθρακα-οξυγόνου ($\nu(\text{CO})$). Οι συμμετρικές δονήσεις που σχετίζονται με το τμήμα άνθρακα-αζώτου-άνθρακα (CNC) εκδηλώνονται ως διακριτές κορυφές που παρατηρούνται στα 829 , 887 και 859 cm^{-1} ²⁶⁷.

Το φάσμα Raman του D-Γλουκουρονικού οξέος (**Εικόνα 3-7**, πράσινο φάσμα) περιλαμβάνει δονήσεις που προέρχονται από τις λειτουργικές ομάδες O-H, καθώς και δονήσεις που σχετίζονται με τις ομάδες -COOH και -CH₂ ²⁶⁴. Το Γλουκουρονικό οξύ παρουσιάζει κορυφές που αντιστοιχούν στον αιθερικό δακτύλιο, συγκεκριμένα στις δονήσεις της αιθερικής ομάδας. Οι κορυφές που υποδηλώνουν τις παραπάνω δονήσεις εντοπίζονται στα 1043 cm⁻¹ για το GLA, λόγω δ(C-H) παραμόρφωσης ⁸⁷. Επιπλέον, το φάσμα Raman παρουσιάζει κορυφές που αποδίδονται σε δονήσεις τάσης ν(C-O-H) στα 1118 cm⁻¹, ενώ η δόνηση τάσης ν(C-O-C) υποδεικνύεται από την κορυφή στα 1164 cm⁻¹ ²⁶⁷. Επιπλέον, παρατηρούνται κορυφές στα 1074 cm⁻¹ και 1232 cm⁻¹ που οφείλονται στις δονήσεις τετνώματος ν(=C-O) (καρβονυλικό τμήμα). Τέλος, η κορυφή στα 1365 cm⁻¹ οφείλεται στην παραμόρφωση δ(O-H) και η κορυφή στα 1708 cm⁻¹ σε δονήσεις τάσης ν(CO) ^{87,267}.

Στην **Εικόνα 3-7** (μπλε φάσμα) παρουσιάζεται το φάσμα Raman για το υβριδικό υλικό SFd@GLA. Αρχικά εντοπίζονται οι κορυφές που αντιστοιχούν στις σκελετικές δονήσεις του μορίου του γλουκουρονικού οξέος. Η κορυφή που εμφανίζεται στα 767 cm⁻¹ οφείλεται στην παρουσία του δεσμού Αμιδίου V, λόγω δονήσεων τάσεων του δεσμού ν(N-H). Οι κορυφές που εμφανίζονται γύρω στα 800-886 cm⁻¹ υποδεικνύουν την παρουσία συμμετρικών δονήσεων που σχετίζονται με τον δεσμό ν(C-N-C). Επίσης εμφανίζεται μια κορυφή στα 926 cm⁻¹ που οφείλεται στην ύπαρξη των δονήσεων δ(OH) του γλουκουρονικού οξέος. Η ανίχνευση του δεσμού Αμιδίου III, που συνδέεται κυρίως με δομές α-έλικας, υποδεικνύεται από τη φασματική κορυφή που παρατηρείται στην περιοχή 1300-1270 cm⁻¹ ²⁶⁹. Η κυρίαρχη κορυφή στα 1673 cm⁻¹ αποδίδεται σε δονήσεις τάσης των δεσμών ν(C=O), οι οποίοι σχετίζονται ιδιαίτερα με τη διαμόρφωση Αμιδίου-I (β φύλλο) ²⁶⁷. Τέλος, η κορυφή που παρατηρείται στα 1620 cm⁻¹ αποδίδεται σε καρβονυλικές ομάδες (C=O), που προέρχονται τόσο από αμιδικούς δεσμούς της πρωτεΐνης όσο και από την ομάδα C=O που προέρχεται από την καρβοξυλική ομάδα του γλουκουρονικού οξέος.



Εικόνα 3-7. Φάσματα Raman για i) το ακατέργαστο μετάξι (SF) (μαύρη γραμμή), ii) το αποκομμωμένο μετάξι (SFd) (κόκκινη γραμμή), iii) το μονομερές του D-γλουκουρονικού οξέος (GLA) (ανοιχτή πράσινη γραμμή) και iv) το υβριδικό υλικό SFd@GLA (μπλε γραμμή).

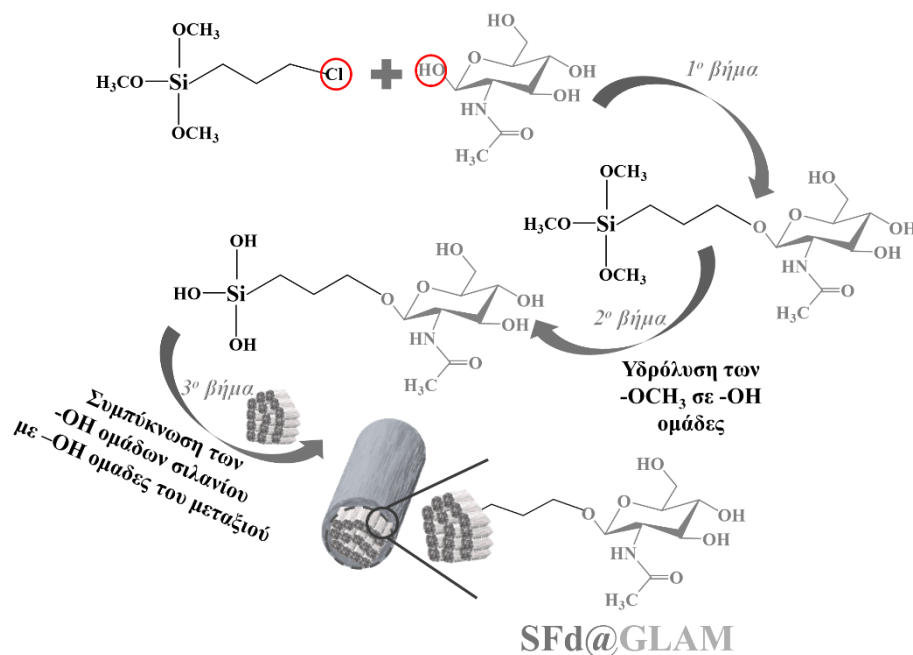
Από τις πιο πάνω μελέτες TG-DTA, FT-IR και Raman επιβεβαιώνεται η ακινητοποίηση του D-Γλουκουρονικού οξέος στην τροποποιημένη με τερματικές αμινομάδες επιφάνεια του αποκομμωμένου μεταξιού (SFd).

3.1.5. Σύνθεση του υβριδικού υλικού SFd@GLAM: Επιφανειακή τροποποίηση της επιφάνειας του αποκομιωμένου μεταξιού (SFd) με το μονομερές της N-Ακετυλ-D-Γλυκοζαμίνης.

Η διεργασία αποκομιώσεως του μεταξιού για την αφαίρεση της σερικίνης πραγματοποιείται όπως ακριβώς περιγράφηκε στην Ενότητα 3.1.2.

3.1.5.1. Αντίδραση της N-Ακετυλ-D-Γλυκοζαμίνης με το εμπορικά διαθέσιμο οργανοσιλάνιο (3-χλωρο προπυλ)τριμεθοξυσιλάνιο και ακινητοποίησή της στην επιφάνεια του αποκομιωμένου μεταξιού (SFd) στο διάλυμα.

Πραγματοποιήθηκε αντίδραση μεταξύ 12.8mg (0.058mmol) N-Ακετυλ-D-Γλυκοζαμίνης και 8μl (0.044mmol) (3-χλωρο προπυλ) τριμεθοξυσιλανίου σε 10 ml μεθανόλης (MeOH). Το μίγμα αντέδρασε υπό αναρροή για 48 ώρες στους 60 °C. Μέσω αυτής της αντίδρασης, ένα νέο οργανοσιλάνιο συντέθηκε in situ, συνοδευόμενο από την ταυτόχρονη απομάκρυνση ενός μορίου HCl. Στη συνέχεια, το νεοσχηματισμένο οργανοσιλάνιο υδρολύθηκε και οι υδροξυλομάδες του (-OH) υπέστησαν συμπύκνωση με τις επιφανειακές υδροξυλομάδες του SFd μέσω πορείας τύπου sol-gel, οδηγώντας στην απελευθέρωση μορίων νερού (**Εικόνα 3-8**). Γι' αυτό το σκοπό, δύο κομμάτια SFd, βάρους περίπου 30 mg, είχαν εισαχθεί στο διάλυμα. Πριν από την προσθήκη τους, τα εν λόγω κομμάτια είχαν εμβαπτιστεί σε ποτήρι ζέσεως που περιείχε 10 ml αιθανόλης για 24 ώρες. Το προκύπτον μίγμα αφήνεται σε αναρροή με θέρμανση για επιπλέον 24 ώρες στους 60 °C (**Εικόνα 3-8**). Στη συνέχεια, το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε σε φυγόκεντρο ROTINA Hettich στις 6000 στροφές ανά λεπτό (rpm) για 7 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (RT) και τα υφάσματα ξεπλύθηκαν με μεθανόλη, αιθανόλη και διαιθυλαιθέρα. Τα τροποποιημένα υφάσματα στη συνέχεια ξηράθηκαν στους 60°C για 24 ώρες.



Εικόνα 3-8. Απεικόνιση της συνθετικής πορείας της επιφανειακής τροποποίησης του αποκομμωμένου μεταξιού (SFd) με N-ακετυλο-D-γλυκοζαμίνη προς τη δημιουργία του υβριδικού υλικού SFd@GLAM.

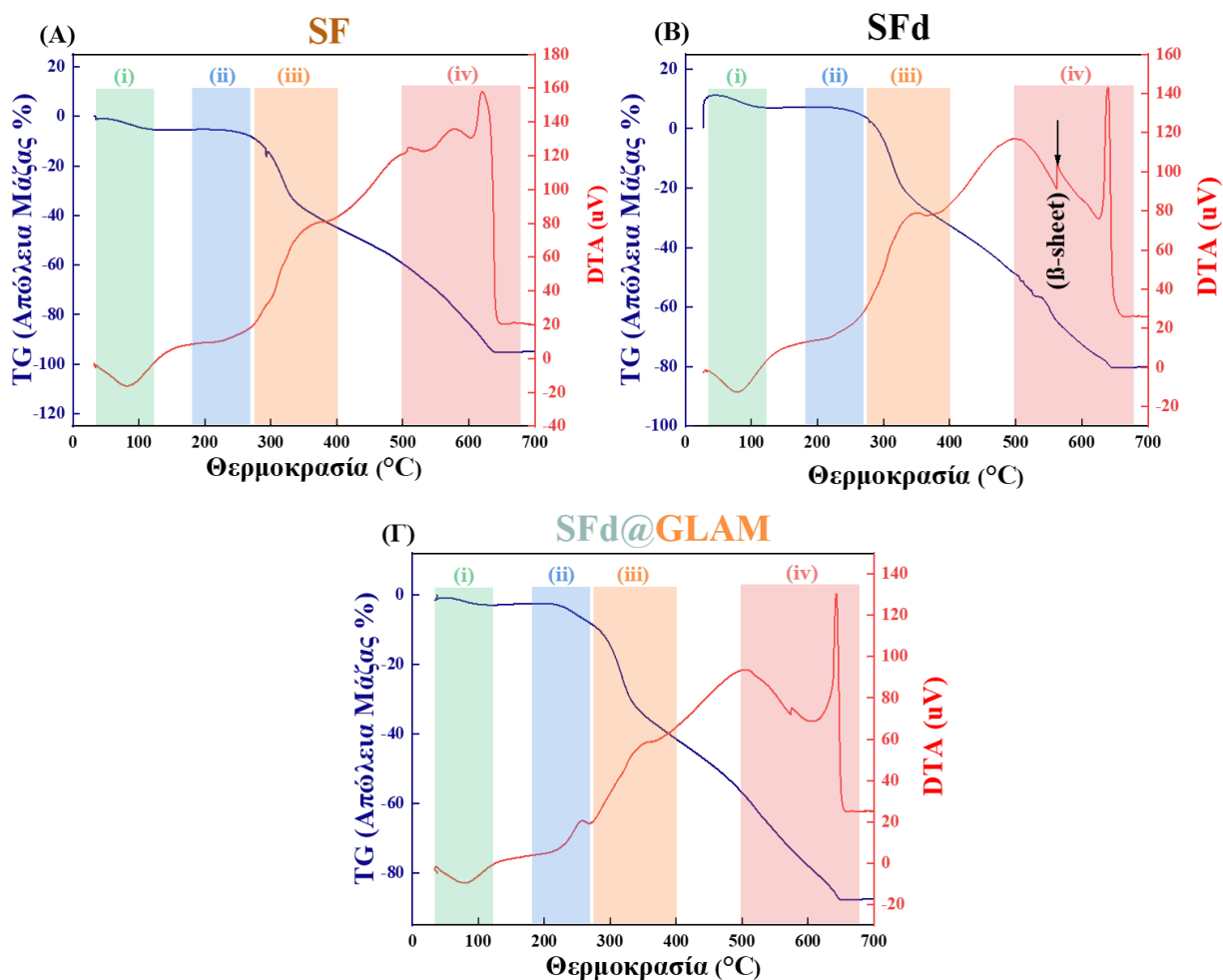
3.1.6. Χαρακτηρισμός του υβριδικού υλικού SFd@GLAM

3.1.6.1. Θερμοσταθμική Διαφορική Θερμική Ανάλυση (TG-DTA)

Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα δεδομένα της διαφορικής θερμοσταθμικής θερμικής ανάλυσης (TG-DTA) για τρία υλικά: ακατέργαστο μετάξι (SF), αποκομμωμένο μετάξι (SFd), και το υβριδικό υλικό SFd@GLAM (**Εικόνα 3-9**). Στα θερμογραφήματα που απεικονίζονται παρακάτω, η κόκκινη γραμμή απεικονίζει τις εξώθερμες και ενδόθερμες μεταβάσεις που παρατηρήθηκαν στη διαφορική θερμική ανάλυση (DTA), ενώ η μπλε γραμμή αναπαριστά το αθροιστικό προφίλ απώλειας μάζας των υπό εξέταση υλικών.

Η Θερμοσταθμική Διαφορική Θερμική Ανάλυση (TG-DTA) για το ακατέργαστο μετάξι καθώς και για το αποκομμωμένο μετάξι έχει αναλυθεί εκτενώς σε προηγούμενη ενότητα. Όπως έχει αναλυθεί σε προηγούμενο κεφάλαιο το συνολικό ποσοστό απώλειας μάζας που παρουσιάζει το SFd στην περιοχή 200-450°C ανέρχεται σε 39.6%. Όσον αφορά το υβριδικό υλικό

SFd@GLAM το συνολικό ποσοστό απώλειας μάζας ανέρχεται στο 48% και έτσι η εναπομένουσα διαφορά των 8.4% μπορεί να αποδοθεί στην γλυκοζαμίνη. Έτσι από το ποσοστό του ολικού οργανικού φορτίου φαίνεται ότι στο υβριδικό υλικό SFd@GLAM περιέχονται 0.29mmol GLAM/gr SFd@GLAM. Η ενδόθερμη μετάβαση που παρατηρείται στους 210 °C στην κόκκινη καμπύλη αποδίδεται στην παρουσία οργανικών διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διαδικασία σύνθεσης. Η έντονη εξώθερμη κορυφή γύρω στους 577 °C συνδέεται με τη διαδικασία αποικοδόμησης των β-φύλλων ²⁰².



Εικόνα 3-9. Η θερμοβαρυνμετρική (TG) και η διαφορική θερμική ανάλυση (DTA) πραγματοποιήθηκαν σε τρία δείγματα: (A) μεταξωτό ύφασμα με SF, (B) SFd και (Γ) SFd@GLAM. Οι περιοχές (i), (ii), (iii) και (iv) απεικονίζουν διακριτά θερμικά συμβάντα: (i) εξάτμιση προσροφημένου νερού, (ii) απελευθέρωση πτητικών ειδών χαμηλής θερμοκρασίας, (iii) διάσπαση πλευρικών αλυσίδων αμινοξέων και ακινητοποιημένης GLAM και (iv) πλήρης αποικοδόμηση των πρωτεϊνών του μεταξιού.

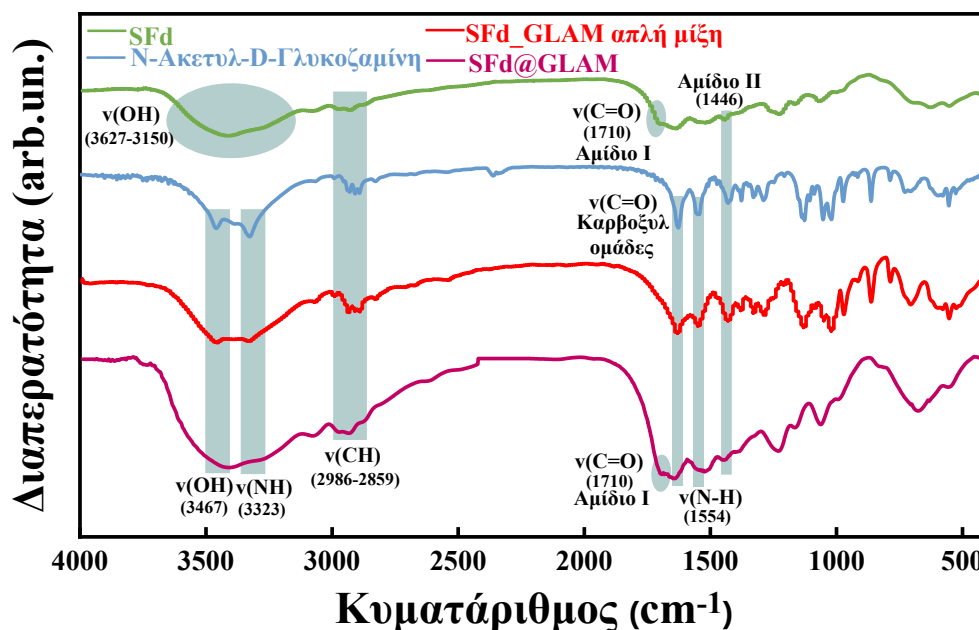
3.1.6.2. Φασματοσκοπία FT-IR

Στην **Εικόνα 3-10** απεικονίζονται τα φάσματα FTIR του υβριδικού υλικού, SFd@GLAM, σε αντιπαράθεση με το αποκομμωμένο μεταξωτό ύφασμα (SFd), το μονομερές της Ν-Ακετυλ-D-Γλυκοζαμίνης, καθώς και το υλικό που προήλθε από απλή ανάμιξη SFd και GLAM για σύγκριση. Το φάσμα FT-IR για το αποκομμωμένο μετάξι (SFd) έχει αναλυθεί λεπτομερώς στην ενότητα 3.1.5.2.

Στην **Εικόνα 3-10** απεικονίζεται το φάσμα FT-IR της Ν-Ακετυλ-D-Γλυκοζαμίνης (GLAM) με ανοιχτή μπλε γραμμή. Οι ταινίες που παρατηρήθηκαν στα 3461 και 3316 cm^{-1} αντιστοιχούν στις ομάδες $\nu(\text{OH})$ και $\nu(\text{NH})$ αντίστοιχα που υπάρχουν στην Ν-Ακετυλ-D-Γλυκοζαμίνη. Η παρουσία των δονήσεων $\nu(\text{CH}_2)$ υποδεικνύεται από τις ταινίες στα, 2826 , 2926 , 2911 και 2935 cm^{-1} ²⁶⁶. Οι ταινίες στα 1287 , 1333 , 1372 και 1433 cm^{-1} αποδίδονται στην κίνηση παραμόρφωσης $\delta(\text{CH}_2)$. Επιπλέον, η ταινία στα 1629 cm^{-1} αποδίδεται στις δονήσεις $\nu(\text{C=O})$ των καρβοξυλικών ομάδων της Ν-ακετυλ-D-γλυκοζαμίνης. Τέλος, η ταινία που παρατηρείται στα 1550 cm^{-1} σχετίζεται με την παρουσία δονήσεων του δεσμού N-H.

Όσον αφορά το φάσμα FT-IR του SFd@GLAM που απεικονίζεται με τη σκούρα κόκκινη γραμμή στην **Εικόνα 3-10** η παρατηρούμενη ταινία στα 3467 cm^{-1} μπορεί να αποδοθεί στις συχνότητες δόνησης που σχετίζονται με την τάση του δεσμού $\nu(\text{O-H})$. Στα 3330 cm^{-1} εξακολουθεί να υφίσταται μια διακριτή ταινία, η οποία αποδίδεται στις ταλαντώσεις δόνησης του δεσμού $\nu(\text{N-H})$. Ταυτόχρονα, οι κορυφές που παρατηρούνται στα 2969 cm^{-1} , 2923 cm^{-1} και 2866 cm^{-1} αποδίδονται σε συχνότητες δόνησης που προκύπτουν από τους δεσμούς $\nu(\text{CH}_2)$. Επιπλέον, η παρουσία μιας κορυφής στα 1697 cm^{-1} μπορεί να αποδοθεί σε δόνηση του $\nu(\text{C=O})$, όμοια με αυτές που παρατηρούνται στο Γλυκουρονικό οξύ και στην πρωτεϊνική ραχοκοκαλιά του SFd. Οι κορυφές που παρατηρούνται στα 1645 cm^{-1} , 1446 cm^{-1} και 1224 cm^{-1} αποδίδονται στους αμιδικούς δεσμούς, του Αμιδίου I, II και III, αντίστοιχα. Αυτά τα φασματικά χαρακτηριστικά αντικατοπτρίζουν εκείνα που παρατηρήθηκαν στα φάσματα του SFd και του SFd@GLA. Επιπλέον, η κορυφή στα 1521 cm^{-1} μπορεί να αποδοθεί στην παρουσία της λειτουργικής ομάδας (N-H). Τέλος, η κορυφή στα 1160 cm^{-1} εμφανίζεται λόγω της ύπαρξης της δόνησης του δεσμού $\nu(\text{C-O})$. Το φάσμα FT-IR του υλικού που προήλθε από την απλή μίξη SFd και GLAM απεικονίζεται στην **Εικόνα 3-10** με κόκκινη γραμμή. Το συγκεκριμένο φάσμα μοιάζει περισσότερο με το φάσμα του μονομερούς της Ν-Ακετυλ-D-Γλυκοζαμίνης. Εμφανίζει τόσο

κορυφές που αντιστοιχούν στην N-Ακετυλ-D-Γλυκοζαμίνη, όσο και στο αποκομμωμένο μετάξι, όπως αναμενόταν.



Εικόνα 3-10. Απεικόνιση των φασμάτων FT-IR για το αποκομμωμένο μετάξι (SFd) (ανοιχτή πράσινη γραμμή), το υβριδικό υλικό SFd@GLAM (σκούρα κόκκινη γραμμή), το υλικό που προήλθε από την απλή ανάμιξη των SFd και GLAM (κόκκινη γραμμή) και το μονομερές της N-Ακετυλ-D-Γλυκοζαμίνης (GLAM) (ανοιχτή μπλε γραμμή).

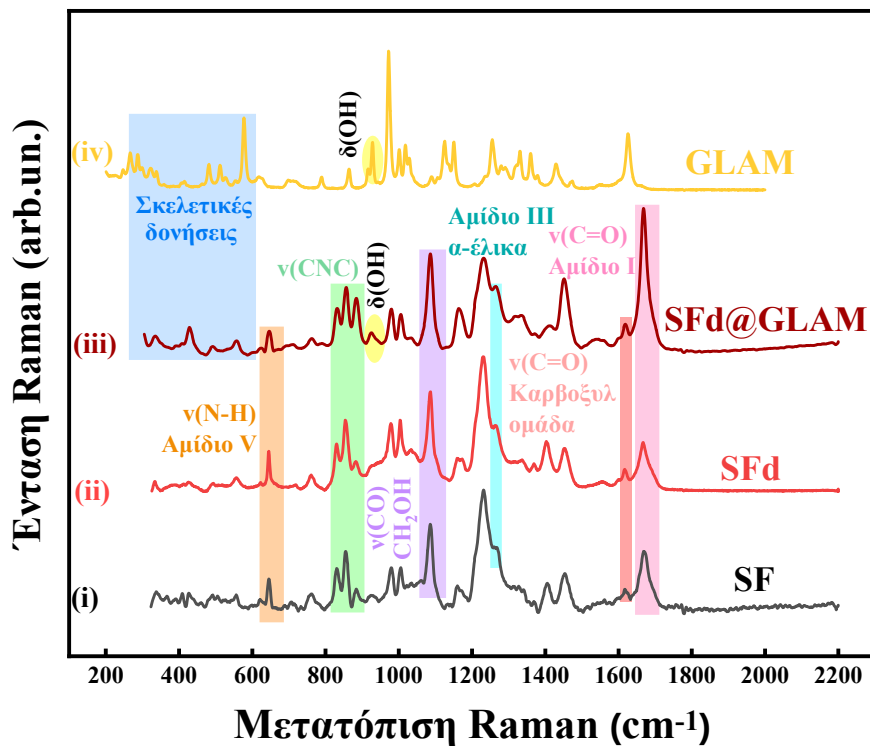
3.1.6.3. Φασματοσκοπία Raman

Στην **Εικόνα 3-11** απεικονίζονται τα φάσματα Raman του υβριδικού υλικού, SFd@GLAM, σε αντιπαράθεση με το αποκομμωμένο μεταξωτό ύφασμα (SFd), το μονομερές της N-Ακετυλ-D-Γλυκοζαμίνης, καθώς και το ακατέργαστο μεταξωτό ύφασμα για σύγκριση. Τα φάσματα Raman για το ακατέργαστο μετάξι (SF) καθώς και για το αποκομμωμένο μετάξι (SFd) έχουν αναλυθεί λεπτομερώς στην ενότητα 3.15.3.

Στην **Εικόνα 3-11** απεικονίζεται το φάσμα Raman για το μονομερές της N-Ακετυλ-D-Γλυκοζαμίνης (κίτρινη γραμμή). Το φάσμα Raman αυτού του μονοσακχαρίτη περιλαμβάνει δονήσεις που προέρχονται από τις ομάδες $-CH_2$ και $N-H$ ²⁶⁴. Και σε αυτό το φάσμα όπως και στο

φάσμα του γλουκουρονικού οξέος παρουσιάζονται κορυφές που σχετίζονται με τον αιθερικό δακτύλιο, οι οποίες αντιστοιχούν ιδιαίτερα στους τρόπους δόνησης της λειτουργικής ομάδας του αιθέρα. Η κορυφή που υποδηλώνει τις παραπάνω δονήσεις εντοπίζεται στα 1029 cm^{-1} για την N-Ακετυλ-D-Γλυκοζαμίνη, λόγω της κίνησης παραμόρφωσης $\delta(\text{C-H})$ ⁸⁷. Επιπλέον, για την N-Ακετυλ-D-Γλυκοζαμίνη το φάσμα Raman παρουσιάζει κορυφή που αποδίδεται στις δονήσεις τάσης $\nu(\text{C-O-H})$ στα 1127 cm^{-1} , ενώ αντίθετα η δόνηση τάσης $\nu(\text{C-O-C})$ παρουσιάζεται στα 1149 cm^{-1} ²⁶⁷. Όσον αφορά την ταινία που παρατηρείται κοντά στα 972 cm^{-1} , προέρχεται από το τμήμα $-\text{CH}_3$ και αντιστοιχεί σε έναν συγκεκριμένο τρόπο δόνησης, δηλαδή σε δονήσεις τύπου-λικνίσματος, ενώ η κορυφή στα 1626 cm^{-1} οφείλεται στη δόνηση παραμόρφωσης $\delta(\text{N-H})$ ⁸⁷.

Επίσης, στην **Εικόνα 3-11** παρουσιάζεται το φάσμα Raman του υβριδικού υλικού SFd@GLAM. Αρχικά φαίνονται οι κορυφές που αντιστοιχούν στις σκελετικές δονήσεις του μορίου της N-Ακετυλ-D-Γλυκοζαμίνης. Η παρουσία του Αμιδίου V που εμφανίζεται λόγω των δονήσεων τάσεων $\nu(\text{N-H})$ υποδηλώνεται από την κορυφή που εμφανίζεται στα 767 cm^{-1} . Οι κορυφές που εμφανίζονται γύρω στα $823\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ υποδεικνύουν την παρουσία συμμετρικών δονήσεων που σχετίζονται με τον δεσμό $\nu(\text{C-N-C})$. Η κορυφή στα 931 cm^{-1} εμφανίζεται λόγω της ύπαρξης των δονήσεων $\delta(\text{OH})$ της N-Ακετυλ-D-Γλυκοζαμίνης (GLAM). Η ανίχνευση του Αμιδίου III, που συνδέεται κυρίως με δομές α-έλικας, αποδεικνύεται από τη φασματική κορυφή που παρατηρείται στην περιοχή $1300\text{-}1270\text{ cm}^{-1}$ ²⁶⁹. Η κορυφή που παρατηρείται στα 1620 cm^{-1} αποδίδεται σε καρβονυλικές ομάδες (C=O), που προέρχονται τόσο από τον αμιδικό δεσμό της πρωτεΐνης όσο και από την ομάδα C=O που προέρχεται από την ακετυλ ομάδα της N-Ακετυλ-D-Γλυκοζαμίνης (GLAM). Τέλος, η κυρίαρχη κορυφή που παρατηρείται στα 1670 cm^{-1} αποδίδεται σε δονήσεις που προκαλούνται από δονήσεις τάσης των δεσμών $\nu(\text{C=O})$, οι οποίοι συνδέονται ιδιαίτερα με τη διαμόρφωση Αμιδίου-I (β φύλλο) ²⁶⁷.



Εικόνα 3-11. Φάσματα Raman για i) το ακατέργαστο μετάξι (SF) (μαύρη γραμμή), ii) το αποκομμωμένο μετάξι (SFd) (κόκκινη γραμμή), iii) το μονομερές της N-Ακετυλ-D-Γλυκοζαμίνης (GLAM) (κίτρινη γραμμή) και iv) το υβριδικό υλικό SFd@GLAM (σκούρα κόκκινη γραμμή).

Οι αναλύσεις TG-DTA και φασματοσκοπίας FT-IR και Raman επιβεβαιώνουν την επιτυχή ακινητοποίηση της N-Ακετυλ-D-Γλυκοζαμίνης στην επιφάνεια του αποκομμωμένου μεταξιού (SFd).

3.1.7. Σύνθεση του διπλά εμβολιασμένου υβριδικού υλικού GLA@SFd@GLAM σε μοριακή αναλογία (GLA:GLAM) [2:1]: Επιφανειακή τροποποίηση του αποκομμιωμένου μεταξιού (SFd) από τα μονομερή D-Γλυκουρονικό οξύ και N-Ακετυλ-D-Γλυκοζαμίνη.

Η διεργασία αποκομμίωσης του μεταξιού για την αφαίρεση της σερίκινης πραγματοποιείται όπως ακριβώς περιγράφηκε στην Ενότητα 3.1.2.

Για τη σύνθεση του διπλά ακινητοποιημένου υβριδικού υλικού GLA@SFd@GLAM είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθούν 4 στάδια.

3.1.7.1. Επιφανειακή τροποποίηση της επιφάνειας του SFd με τερματικές αμινομάδες

Δύο κομμάτια από το αποκομμιωμένο μεταξωτό ύφασμα (SFd), που περιέχει μόνο φιμπροΐνη, βυθίστηκαν σε 10 mL αιθανόλης για 24 ώρες. Μετά την επώαση, τα δείγματα SFd μεταφέρθηκαν σε ένα μίγμα αντίδρασης που περιείχε 10mL μεθανόλης, 0.044 mmol (3-αμινοπροπυλ)τριαθοξυσιλανίου και 5 mL αιθανόλης. Αυτό το μίγμα θερμάνθηκε υπό αναρροή στους 60 °C για 24 ώρες. Στη συνέχεια, το προκύπον υλικό SFd@NH₂ πλύθηκε με φυγοκέντρηση χρησιμοποιώντας διαλύτες μεθανόλη, αιθανόλη και διαιθυλαιθέρα, ο καθένας στις 6000 rpm για 7 λεπτά χρησιμοποιώντας φυγόκεντρο ROTINA Hettich. Μετά τη φυγοκέντρηση, το υλικό ξηραίνεται στον αέρα για 24 ώρες.

3.1.7.2. Ακινητοποίηση του D-Γλουκουρονικού οξέος στην αμινοπροπυλ-τροποποιημένη επιφάνεια του SFd.

Παρασκευάστηκε διάλυμα που περιείχε 7.4 mg (0.038 mmol) D-γλουκουρονικού οξέος και 2.5 mg (0.016 mmol) EDC (υδροχλωρικό N-(3-(διμεθυλαμινο)προπυλ)-N'-αιθυλοκαρβοδιιμίδιο) σε 10 mL μεθανόλης. Αυτό το διάλυμα υποβλήθηκε σε υπερήχους για να εξασφαλιστεί ένα ομοιογενές εναιώρημα και πλήρης διάλυση των αντιδραστηρίων. Πριν από την χρήση αυτού του διαλύματος, 30 mg υλικού SFd@NH₂ βυθίστηκαν σε 10 mL αιθανόλης για 24 ώρες για να διευκολυνθεί η ενεργοποίηση των επιφανειακών αμινομάδων. Ακολούθως, το επεξεργασμένο με αιθανόλη SFd@NH₂ εισήχθει στο προπαρασκευασμένο διάλυμα μεθανόλης και το μίγμα υποβλήθηκε σε ανάδευση υπό αναρροή στους 60 °C για 24 ώρες. Αυτή η πορεία προάγει την

αντίδραση σύζευξης μεταξύ του αμινο-λειτουργικού SFd και του D-γλυκουρονικού οξέος, με τη μεσολάβηση του παράγοντα σύζευξης EDC.

Ακολούθως, το προκύπτον SFd@GLA υποβλήθηκε σε εκτενή πλύση για την απομάκρυνση ουσιών και παραπροϊόντων που δεν αντέδρασαν. Η πλύση πραγματοποιήθηκε διαδοχικά με μεθανόλη, αιθανόλη και διαιθυλαιθέρα, με φυγοκέντρηση στις 6000 rpm χρησιμοποιώντας φυγόκεντρο ROTINA Hettich για 7 λεπτά. Μετά τη φυγοκέντρηση, το υλικό ξηράθηκε στον αέρα για 24 ώρες για να εξατμιστούν τυχόν υπολειμματικοί διαλύτες, με αποτέλεσμα το τελικό καθαρό και ξηρό τροποποιημένο ύφασμα SFd@GLA.

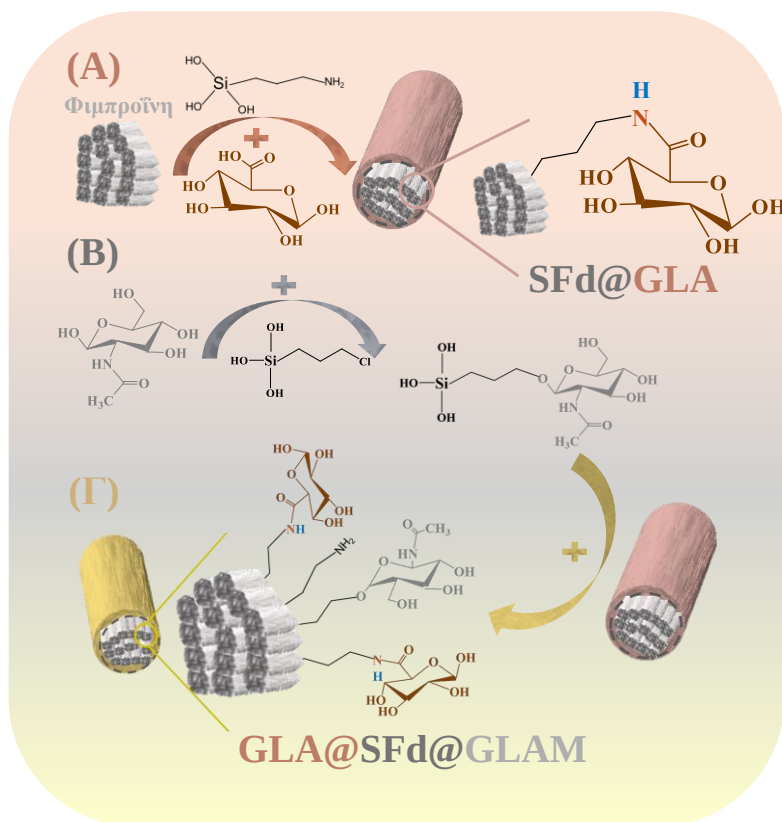
3.1.7.3. Αντίδραση του (χλωροπροπυλ)τριμεθοξυσιλανίου με την N-Ακετυλ-D-Γλυκοζαμίνη

12.8 mg (0.058 mmol) N-ακετυλ-D-γλυκοζαμίνης αντέδρασαν με 8 μl (0.044 mmol) 3-χλωροπροπυλοτριμεθοξυσιλανίου σε 10 ml μεθανόλης (MeOH). Το προκύπτον μίγμα θερμάνθηκε υπό κάθετο ψυκτήρα για 48 ώρες στους 60°C.

3.1.7.4. Προσθήκη του υβριδικού υλικού SFd@GLA στο πιο πάνω διάλυμα

Μετά τις 48 ώρες, δύο κομμάτια SFd@GLA, βάρους περίπου 30 mg, εισήχθησαν στο διάλυμα. Πριν από την προσθήκη τους, τα εν λόγω κομμάτια είχαν εμβαπτιστεί σε ποτήρι ζέσεως που περιείχε 10 ml αιθανόλης για 24 ώρες. Το προκύπτον μίγμα με τα κομμάτια υφάσματος υποβλήθηκε σε αναρροή για επιπλέον 24 ώρες στους 60 °C. Στη συνέχεια, το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε με φυγόκεντρο ROTINA Hettich στις 6000 στροφές ανά λεπτό (rpm) για 7 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (RT) για να ξεπλυθεί χρησιμοποιώντας μεθανόλη, αιθανόλη και διαιθυλαιθέρα. Το προϊόν που προέκυψε στη συνέχεια ξηράθηκε στους 60°C για 24 ώρες.

Μέσω του πιο πάνω σταδίου συντίθεται το υβριδικό υλικό GLA@SFd@GLAM (**Εικόνα 3-12**), που είναι διπλά εμβολιασμένο και φέρει ομοιοπολικά συνδεδεμένα και τα δύο μονομερή του υαλουρονικού οξέος, δηλαδή το D-Γλυκουρονικό οξύ και την N-Ακετυλ-D-Γλυκοζαμίνη ταυτόχρονα.



Εικόνα 3-12. Συνθετική πορεία του διπλά εμβολιασμένου υβριδικού υλικού {GLA@SFd@GLAM} που φέρει [GLA:GLAM] μοριακή αναλογία ίση με [2:1].

3.1.8. Χαρακτηρισμός του υβριδικού υλικού GLA@SFd@GLAM

3.1.8.1. Θερμοσταθμική Διαφορική Θερμική Ανάλυση (TG-DTA)

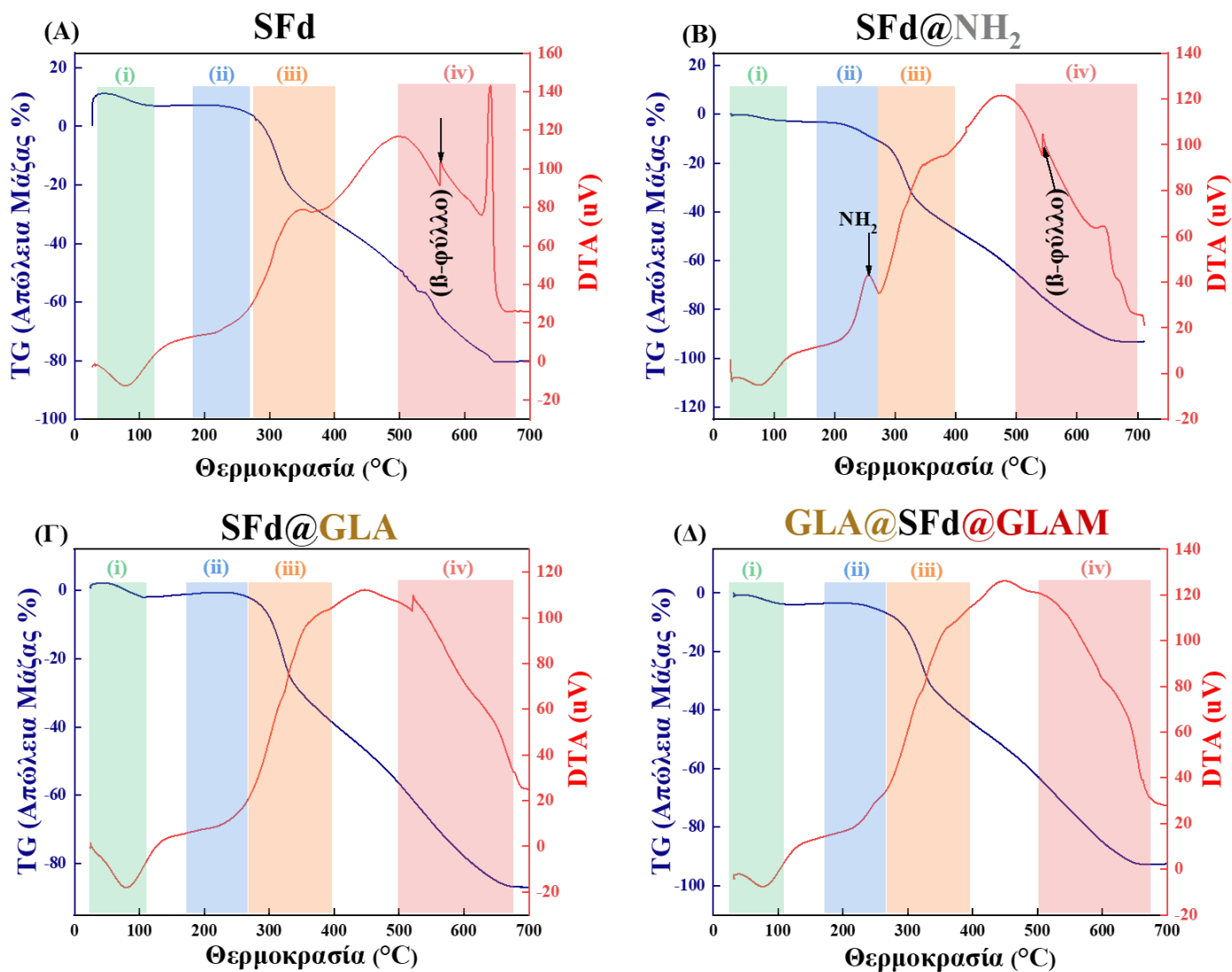
Η **Εικόνα 3-13** απεικονίζει τα θερμογράμματα που αντιστοιχούν σε SFd, SFd@NH₂, SFd@GLA και GLA@SFd@GLAM. Στα παρουσιαζόμενα θερμοφήματα της **Εικόνα 3-13**, η κόκκινη γραμμή οριοθετεί τις εξώθερμες και ενδόθερμες μεταπτώσεις που παρατηρούνται στο θερμογράφημα (DTA), ενώ η μπλε γραμμή αντιπροσωπεύει το προφίλ ολικής απώλειας μάζας του υλικού που εξετάζεται.

Η **Εικόνα 3-13** απεικονίζει το θερμογράφημα για το υλικό SFd. Η απώλεια βάρους που παρατηρείται κάτω από τους 110 °C αποδίδεται σε πορεία εκρόφησης, η οποία χαρακτηρίζεται κυρίως από την εξάτμιση προσροφημένων μορίων νερού. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 3-13**, εντός

του εύρους θερμοκρασίας από 170 έως 275 °C, υπάρχει αποβολή πτητικών συστατικών, ενώ εντός της θερμοκρασιακής περιοχής από 275 έως 400 °C, συμβαίνει η διάσπαση των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων. Επιπρόσθετα, το πιο κάτω γράφημα εμφανίζει μια εμφανή κορυφή στους 577 °C, η οποία αποδίδεται στην υποβάθμιση των δομών β-φύλλων.

Επίσης στην ίδια **Εικόνα 3-13** παρουσιάζεται το θερμογράφημα για το υλικό SFd@NH₂. Μια αξιοσημείωτη εξώθερμη κορυφή παρατηρείται εντός της περιοχής θερμοκρασιών 250-300 °C, η οποία αποδίδεται στην αποικοδόμηση των τερματικών αμινομάδων που υπάρχουν στο υλικό SFd@NH₂. Το αθροιστικό ποσοστό απώλειας μάζας για SFd@NH₂ που παρατηρείται στην περιοχή θερμοκρασιών 200-400 °C αντανakλά κυρίως την αποσύνθεση των πλευρικών αλυσίδων αμινοξέων και των χαρακτηριστικών αμινομάδων της εμβολιασμένης προπυλ-αμίνης, που ανέρχονται συνολικά σε 43.8%. Δεδομένου ότι το SFd εμφανίζει συνολική απώλεια μάζας 39.6% εντός του εύρους θερμοκρασιών 200-400°C, το υπόλοιπο 4.3% αποδίδεται στις ομάδες H₂N(CH₂)₃. Αυτό αντιστοιχεί σε 0.73 mmol εμβολιασμένων αμινομάδων ανά γραμμάριο SFd@NH₂. Ακολούθως, η απώλεια μάζας που παρατηρείται για το SFd@GLA, όπως απεικονίζεται στην **Εικόνα 3-13**, είναι 51%. Αφαιρώντας την απώλεια μάζας 43.8% που σχετίζεται με το SFd@NH₂, ένα υπόλοιπο 7% αποδίδεται στην καύση του εμβολιασμένου γλουκουρονικού οξέος GLA. Αυτό αντιστοιχεί σε περίπου 0.29 mmol εμβολιασμένου GLA ανά γραμμάριο SFd@GLA.

Τέλος, το θερμογράφημα του διπλά εμβολιασμένου υβριδικού υλικού GLA@SFd@GLAM παρουσιάζει συνολική απώλεια μάζας 54%. Κατά συνέπεια, αφαιρώντας το τμήμα που αποδίδεται σε NH₂(CH₂)₃ και GLA, που ανέρχεται σε 51%, παραμένει ένα υπόλειμμα 3%, που ισοδυναμεί με 0.13 mmol GLAM ανά γραμμάριο GLA@SFd@GLAM. Βάσει αυτού, το διπλά εμβολιασμένο υλικό GLA@SFd@GLAM φέρει τα μονομερή GLA και GLAM σε μοριακή αναλογία [2:1] περίπου, όπως και το φυσικό υαλουρονικό οξύ.



Εικόνα 3-13. Η θερμοβαρυμετρική (TG) και η διαφορική θερμική ανάλυση (DTA) διεξήχθησαν για (A) SFd, (B) SFd@NH₂, (C) SFd@GLA και (D) GLA@SFd@GLAM. Τα αντίστοιχα πεδία (i), (ii), (iii) και (iv) απεικονίζουν διακριτά θερμικά γεγονότα: (i) εξάτμιση προσροφημένου νερού, (ii) εξάλειψη πτητικών ειδών, (iii) διάσπαση πλευρικών αλυσίδων αμινοξέων και εμβολιασμένων μορίων, και (iv) πλήρης αποικοδόμηση των πρωτεϊνών του μεταξιού.

3.1.8.2. Φασματοσκοπία FT-IR

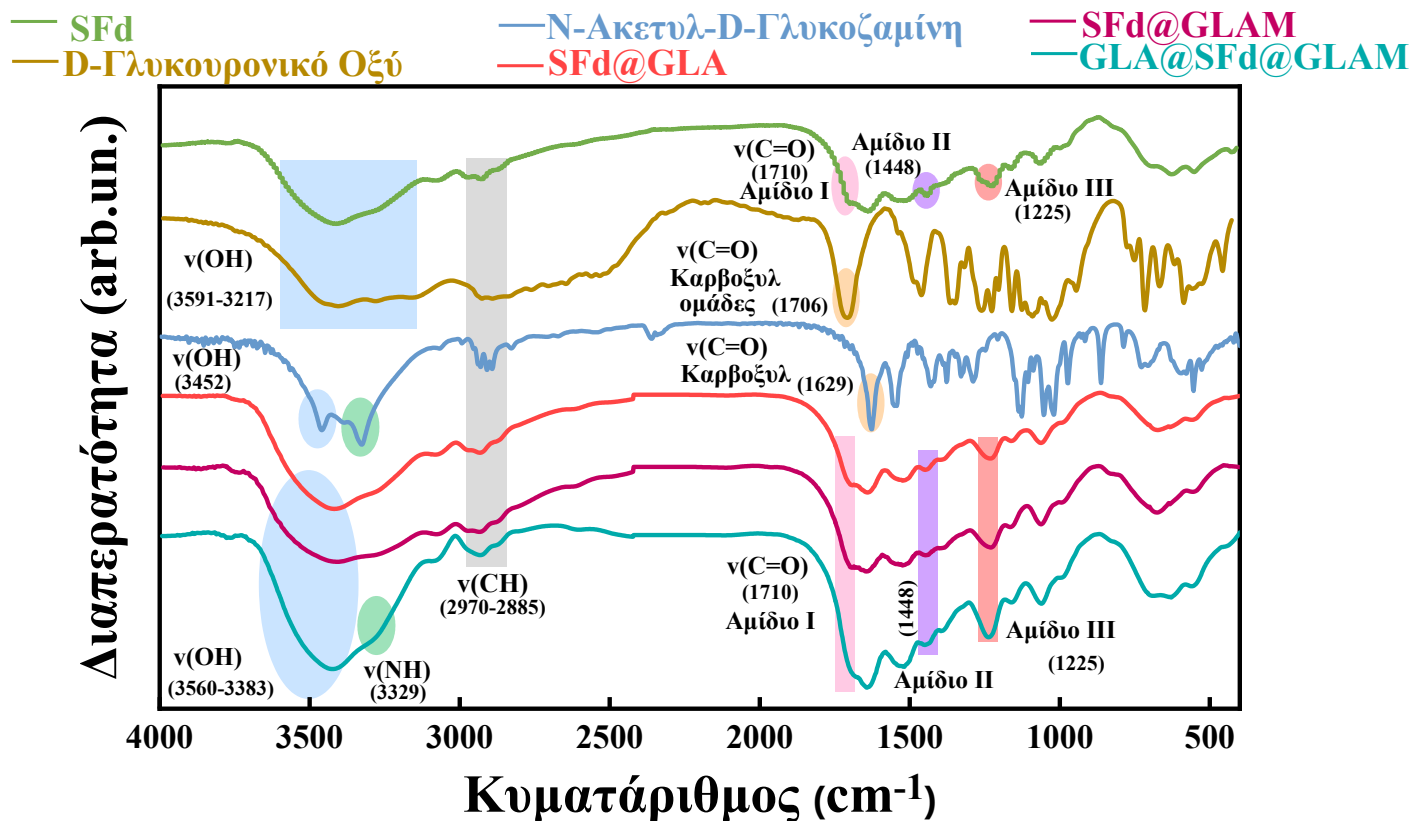
Στην **Εικόνα 3-14** παρουσιάζονται τα φάσματα FTIR των υβριδικών υλικών SFd@GLA, SFd@GLAM και του διπλά εμβολιασμένου υβριδικού υλικού {GLA@SFd@GLAM}, μαζί με το αποκομμιωμένο μεταξωτό ύφασμα (SFd). Για σύγκριση, περιλαμβάνονται επίσης τα φάσματα σκόνης D-Γλουκουρονικού Οξέος και N-Ακετυλ-D-Γλυκοζαμίνης.

Συγκεκριμένα η πράσινη γραμμή της **Εικόνα 3-14** δείχνει το φάσμα FT-IR του αποκομμιωμένου μεταξωτού υφάσματος (SFd). Σε αυτό το φάσμα, μια κορυφή στα 3423 cm^{-1} αποδίδεται στις δονήσεις τάσης των δεσμών υδροξυλίου $\nu(\text{OH})$. Οι κορυφές που παρατηρήθηκαν στα 3080 , 2984 και 2925 cm^{-1} , αντιστοιχούν στις δονήσεις τάσης των δεσμών C-H των μεταξωτών ινών ²⁶⁵. Η εμφάνιση κορυφών στα 1640 , 1438 και 1238 cm^{-1} υποδεικνύει την ύπαρξη δεσμών Αμιδίου I, II και III, αντίστοιχα. Οι κορυφές αυτές σχετίζονται με τις δονήσεις τάσης και κάμψης των δεσμών καρβονυλίου (C=O) και N-H, παρέχοντας ενδείξεις για το σχηματισμό δευτεροταγούς δομής της πρωτεΐνης. Η κορυφή που παρατηρείται στα 1710 cm^{-1} αποδίδεται στις δονήσεις του δεσμού $\nu(\text{C=O})$ εντός της δομής β-φύλλου του Αμιδίου I ²⁶⁵. Τέλος, η εμφάνιση μιας κορυφής στα 1176 cm^{-1} σηματοδοτεί την παρουσία δονήσεων των δεσμών (C-OH).

Η ανοιχτή καφέ γραμμή της **Εικόνα 3-14** απεικονίζει το φάσμα FT-IR του μονοσακχαρίτη του D-γλουκουρονικού οξέος. Η φασματική κορυφή στα 3407 cm^{-1} αποδίδεται στην παρουσία των ομάδων υδροξυλίου (OH) του GLA ²⁶⁴. Οι κορυφές που παρατηρούνται στα 2895 και 2931 cm^{-1} αποδίδονται στις δονήσεις τάσης των ομάδων $\nu(\text{CH}_2)$. Επιπροσθέτως, η κορυφή στα 1707 cm^{-1} αντιστοιχεί στις δονήσεις κάμψης της καρβονυλικής ομάδας $\delta(\text{C=O})$ ²⁶⁵. Οι κορυφές που ανιχνεύθηκαν στα 1460 , 1358 , 1263 και 1224 cm^{-1} αποδίδονται επίσης στις δονήσεις τάσης των ομάδων $\nu(\text{CH}_2)$. Τέλος, η κορυφή στα 1163 cm^{-1} αποδίδεται στις δονήσεις τάσης των δεσμών C-O.

Η γαλάζια γραμμή στην **Εικόνα 3-14** δείχνει το φάσμα FT-IR της N-ακετυλ-D-γλυκοζαμίνης (GLAM). Οι κορυφές που παρατηρήθηκαν στα 3461 και 3316 cm^{-1} αντιστοιχούν στις ομάδες $\nu(\text{OH})$ και $\nu(\text{NH})$ αντίστοιχα της GLAM. Η παρουσία των δονήσεων $\nu(\text{CH}_2)$ υποδεικνύεται από τις κορυφές στα, 2826 , 2926 , 2911 και 2935 cm^{-1} ^{87,202}. Οι κορυφές στα 1287 , 1333 , 1372 και 1433 cm^{-1} αποδίδονται στην κλήση παραμόρφωσης $\delta(\text{CH}_2)$. Επιπλέον, η κορυφή στα 1629 cm^{-1} αποδίδεται στις δονήσεις $\nu(\text{C=O})$ των καρβοξυλικών ομάδων της N-ακετυλο-D-

γλυκοζαμίνης. Τέλος, η κορυφή που παρατηρείται στα 1550 cm^{-1} δηλώνει την παρουσία δονήσεων του δεσμού N-H.



Εικόνα 3-14. Φάσματα FT-IR για τα SFd (πράσινη γραμμή), D-γλυκουρονικό οξύ (GLA) (ανοιχτή καφέ γραμμή), N-ακετυλο-D-γλυκοζαμίνη (GLAM) (ανοιχτή μπλε γραμμή), SFd@GLA (κόκκινη γραμμή), SFd@GLAM (σκούρα κόκκινη γραμμή) και το διπλά εμβολιασμένο υβριδικό υλικό {GLA@SFd@GLAM} [2:1] (κυανή γραμμή).

Σε ότι αφορά τα φάσματα των υβριδικών υλικών SFd@GLA, SFd@GLAM και των μονομερών GLA και GLAM αναλύθηκαν εκτενώς στα προηγούμενα κεφάλαια.

Το υπέρυθρο φάσμα του GLA@SFd@GLAM, που απεικονίζεται με την κυανή γραμμή στην **Εικόνα 3-14**, παρουσιάζει μια εξέχουσα κορυφή στα 3432 cm^{-1} . Η κορυφή αυτή αντιστοιχεί σε δονήσεις που σχετίζονται με την τάση των δεσμών O-H. Οι κορυφές στα 2971, 2922 και 2865 cm^{-1} οφείλονται στις δονήσεις τάσης των δεσμών $\nu(\text{CH}_2)$. Επιπλέον, η κορυφή στα 1703 cm^{-1} αποδίδεται στις δονήσεις τάσης των δεσμών $\nu(\text{C=O})$. Οι κορυφές που παρατηρούνται στα 1631 cm^{-1} , 1448 cm^{-1} και 1224 cm^{-1} αποδίδονται στις δονήσεις των αμιδικών δεσμών, που

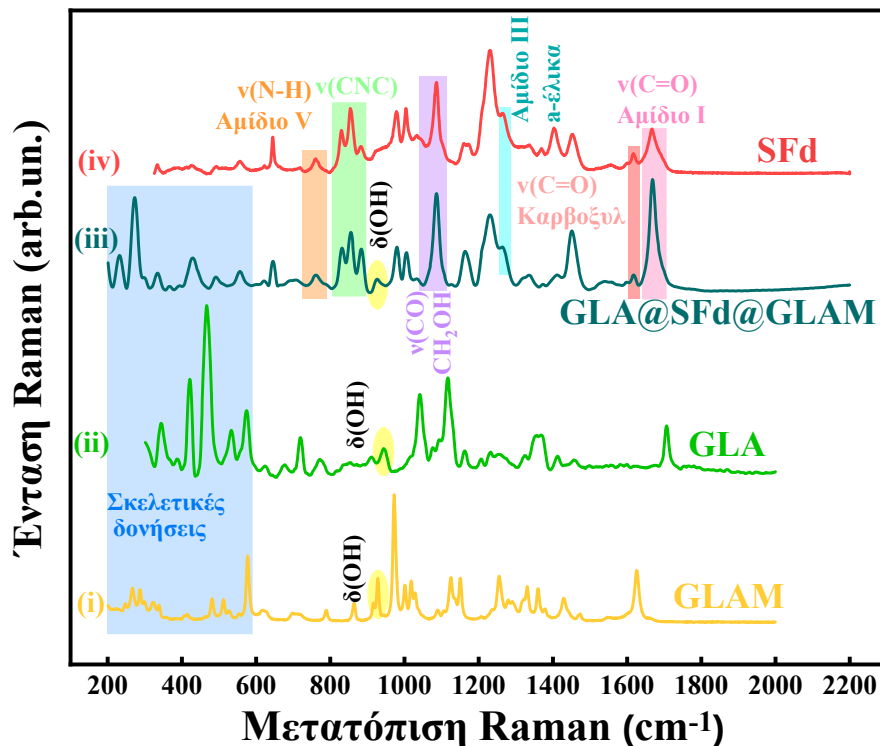
αντιπροσωπεύουν το Αμίδιο I, II και III, αντίστοιχα. Επιπλέον, η παρουσία της κορυφής στα 1521 cm^{-1} αντιστοιχεί στους χαρακτηριστικούς τρόπους δόνησης που σχετίζονται με τη λειτουργική ομάδα (N-H). Τέλος, η κορυφή στα 1169 cm^{-1} εμφανίζεται λόγω της ύπαρξης της δόνησης $\nu(\text{C-O})$ ²⁶⁵.

3.1.8.3. Φασματοσκοπία Raman

Η **Εικόνα 3-15** i και ii εμφανίζει τα φάσματα Raman των μονομερών N-ακετυλ-D-γλυκοζαμίνης (GLAM, κίτρινη γραμμή) και D-γλουκουρονικού οξέος (GLA ανοιχτή πράσινη γραμμή), αντίστοιχα. Τα φάσματα Raman αυτών των μονοσακχαριτών αποκαλύπτουν δονήσεις που σχετίζονται με τις λειτουργικές ομάδες O-H και N-H, καθώς και δονήσεις που σχετίζονται με τις ομάδες $-\text{COOH}$, $-\text{CH}_2$, και $>\text{N-H}$ ²⁶⁴. Τόσο το GLAM όσο και το GLA εμφανίζουν κορυφές που αντιστοιχούν στον αιθερικό δακτύλιο, συγκεκριμένα τις δονήσεις της ομάδας αιθέρα. Οι κορυφές που σχετίζονται με αυτές τις δονήσεις παρατηρούνται στα 1029 cm^{-1} για το GLAM και στα 1043 cm^{-1} για το GLA, αντιστοιχώντας στην κλήση παραμόρφωσης $\delta(\text{C-H})$ ⁸⁷.

Τα φάσματα Raman αποκαλύπτουν περαιτέρω κορυφές που σχετίζονται με τις δονήσεις τάσης $\nu(\text{C-O-H})$, που παρατηρήθηκαν στα 1127 cm^{-1} για τη N-ακετυλο-D-γλυκοζαμίνη (GLAM) και στα 1118 cm^{-1} για το D-Γλουκουρονικό οξύ (GLA). Επιπλέον, οι δονήσεις τάσης $\nu(\text{C-O-C})$ εμφανίζονται στα 1149 cm^{-1} για το GLAM και στα 1164 cm^{-1} για το GLA²⁶⁷. Για το μονομερές της N-ακετυλ-D-γλυκοζαμίνης, η ταινία κοντά στα 972 cm^{-1} αποδίδεται σε κραδασμούς ταλάντωσης του τμήματος $-\text{CH}_3$, ενώ η κορυφή στα 1626 cm^{-1} αντιστοιχεί σε $\delta(\text{N-H})$ δονήσεις παραμόρφωσης⁸⁷. Ακολούθως, στο φάσμα Raman του D-γλουκουρονικού οξέος (**Εικόνα 3-15** ii), οι κορυφές στα 1074 cm^{-1} και 1232 cm^{-1} αποδίδονται στις δονήσεις τάσης $\nu(\text{C-O})$ του καρβονυλικού τμήματος. Επιπροσθέτως, η κορυφή στα 1365 cm^{-1} αντιστοιχεί σε $\delta(\text{O-H})$ δονήσεις παραμόρφωσης, ενώ η κορυφή στα 1708 cm^{-1} αποδίδεται σε $\nu(\text{CO})$ δονήσεις τάσης^{87,267}.

Η κόκκινη γραμμή της **Εικόνα 3-15** iv αντιπροσωπεύει το φάσμα Raman του υλικού SFd, το οποίο έχει αναλυθεί εκτενώς σε προηγούμενα υποκεφάλαια.



Εικόνα 3-15. Φάσματα Raman (i) του μονομερούς της N-Ακετυλ-D-Γλυκοζαμίνης (GLAM) (κίτρινη γραμμή) (ii) του μονομερούς του D-Γλουκουρονικού οξέος (GLA) (ανοιχτό πράσινο γραμμή), (iii) του διπλά εμβολιασμένου υβριδικού υλικού GLA@SFd@GLAM (πράσινη γραμμή) και (iv) του SFd (κόκκινη γραμμή).

Το φάσμα Raman της **Εικόνα 3-15** iii απεικονίζει το φάσμα του διπλά εμβολιασμένου υβριδικού υλικού GLA@SFd@GLAM. Η κορυφή που παρατηρείται στα 1680 cm^{-1} αποδίδεται σε ομάδες καρβονυλίου (C=O), που προέρχονται τόσο από τον αμιδικό δεσμό πρωτεΐνης όσο και από την ομάδα C=O που προέρχεται από την καρβοξυλομάδα του GLA. Οι κορυφές που παρατηρούνται στα 829 , 887 και 859 cm^{-1} προκύπτουν από τις συμμετρικές $\nu(\text{CNC})$ δονήσεις, υποδεικνύοντας τη σύζευξη των μονομερών με το SFd ²⁶⁷. Η κορυφή που παρατηρείται στα 1083 cm^{-1} αντιστοιχεί στη δόνηση $\nu(\text{CO})$ του δεσμού CH_2OH και οι κορυφές που παρατηρούνται στην περιοχή $1300\text{--}1270\text{ cm}^{-1}$ αποδίδονται στην παρουσία του Αμιδίου-II που σχετίζεται με τη δομή α-έλικας ^{268,269}. Τελικά, η παρουσία της κορυφής στα 1680 cm^{-1} δηλώνει την παρουσία του δεσμού C=O , ο οποίος θα μπορούσε να προέρχεται από την ομάδα Αμιδίου I ή το τμήμα C=O της N-ακετυλ-D-γλυκοζαμίνης. Αυτή η κορυφή εμφανίζεται εδώ πιο έντονη και μεγαλύτερη, πιθανώς

λόγω της συμβολής της τελευταίας. Οι κορυφές που εκτείνονται από $200-550\text{ cm}^{-1}$ στα φάσματα i, ii και iii σχετίζονται με τη δόνηση του δεσμού του σκελετού (C-C) ²⁶⁷.

Συμπερασματικά, τα φάσματα FT-IR και Raman των υβριδικών υλικών χαρακτηρίζονται κυρίως από τις κορυφές που σχετίζονται με την πρωτεϊνική ραχοκοκαλιά του μεταξιού. Ωστόσο, παρατηρούνται επίσης πρόσθετα στοιχεία από τα μονομερή D-Γλυκουρονικό οξύ (GLA) και N-ακετυλ-D-γλυκοζαμίνη (GLAM), τα οποία υποδεικνύονται από αλλαγή στο φασματικό προφίλ σε μια συγκεκριμένη περιοχή των υβριδικών υλικών. Ειδικότερα, οι κορυφές που αντιστοιχούν σε δονήσεις τάσης C-O γίνονται πιο έντονες στα φάσματα των υβριδικών υλικών υποστηρίζοντας την ακινητοποίηση των GLA και GLAM στο μεταξωτό ύφασμα.

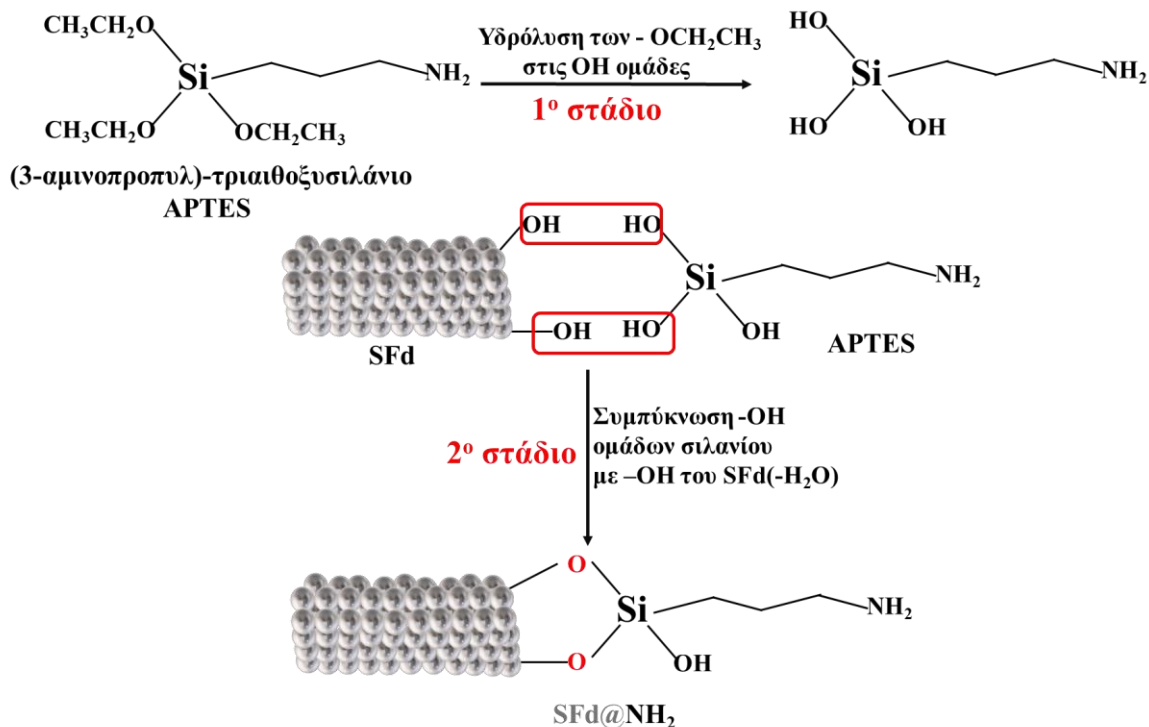
Αφού είδαμε ότι πραγματοποιήθηκε με επιτυχία η σύνθεση των υβριδικών υλικών των μονομερών του υαλουρονικού οξέος GLA, GLAM καθώς και του τεχνητού υαλουρονικού οξέος GLA@SFd@GLAM, αποφασίσαμε να προσπαθήσουμε να ακινητοποιήσουμε και το γαλλικό οξύ, όντας ισχυρό αντιοξειδωτικό, πάνω στην επιφάνεια του αποκομμιωμένου μεταξιού (SFd). Ως εκ τούτου, ακολουθεί η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός του υβριδικού υλικού SFd@GA.

3.1.9. Σύνθεση του υβριδικού υλικού SFd@GA: Επιφανειακή τροποποίηση του αποκομμιωμένου μεταξιού (SFd) με το μονομερές του γαλλικού οξέος (GA)

Η διεργασία αποκομμίωσης του μεταξιού για την αφαίρεση της σερίκνης πραγματοποιείται όπως ακριβώς περιγράφηκε στην Ενότητα 3.1.2.

3.1.9.1. Η πρόδρομη ένωση με αμινο-τελικό άκρο αντιδρά με την αποκομμιωμένη μεταξωτή ίνα (SFd ύφασμα), με αποτέλεσμα το σχηματισμό του υλικού SFd@NH₂.

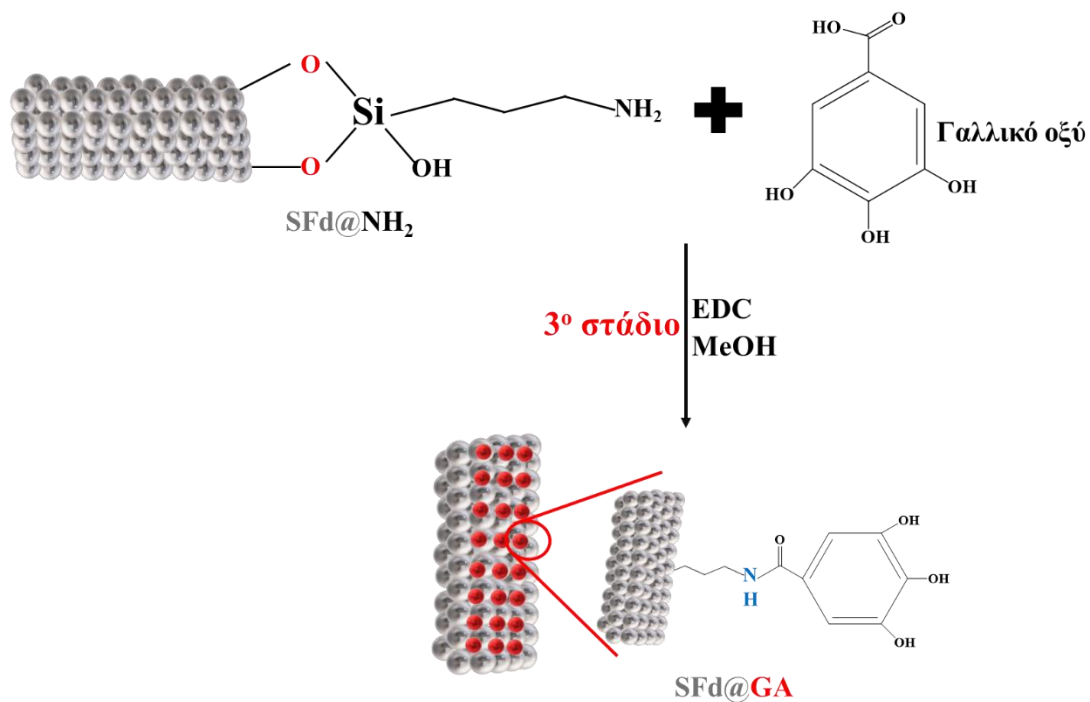
Ακολουθήθηκε ακριβώς η ίδια διαδικασία όπως περιγράφηκε στην ενότητα 3.1.2.1. Στο παρακάτω σχήμα δίνονται οι αντιδράσεις οι οποίες πραγματοποιούνται κατά τη διάρκεια της σύνθεσης του υλικού SFd@NH₂ (Εικόνα 3-16).



Εικόνα 3-16. Συνθετική πορεία επιφανειακής τροποποίησης του ινώδους μεταξιού με τερματικές αμινομάδες.

3.1.9.2. Ομοιοπολικός εμβολιασμός του γαλλικού οξέος στο υλικό SFd@NH₂

Αρχικά, δύο κομμάτια του SFd@NH₂ (30 mg), εμβαπτίστηκαν σε 10 ml αιθανόλης για 24 ώρες πριν από τη χρήση τους. Ακολούθως, παρασκευάστηκε διάλυμα που περιείχε 0.036 mmol γαλλικού οξέος και 0.012 mmol υδροχλωρικού N-(3-(διμεθυλαμινο)προπυλ)-N'-αιθυλοκαρβοδιμιδίου (EDC) σε 10 ml μεθανόλης. Το διάλυμα αυτό υποβλήθηκε σε κατεργασία με υπερήχους, ενώ στη συνέχεια, το εμποτισμένο SFd@NH₂ προστέθηκε στο διάλυμα μαζί με 5 ml αιθανόλης και το προκύπτον διάλυμα θερμάνθηκε υπό συνθήκες αναρροής στους 60°C για 24 ώρες. Το τροποποιημένο υλικό SFd@GA πλύθηκε διαδοχικά με μεθανόλη, αιθανόλη και διαιθυλαιθέρα μέσω φυγοκεντρήσεων στις 6000 στροφές ανά λεπτό με φυγόκεντρο ROTINA Hettich για 7 λεπτά. Στη συνέχεια, το υβριδικό υλικό ξηράθηκε στον αέρα (Dry-Pistol) για 24 ώρες. Στο παρακάτω σχήμα δίνονται οι αντιδράσεις της πορείας προς σχηματισμό του υβριδικού υλικού SFd@GA (Εικόνα 3-17).

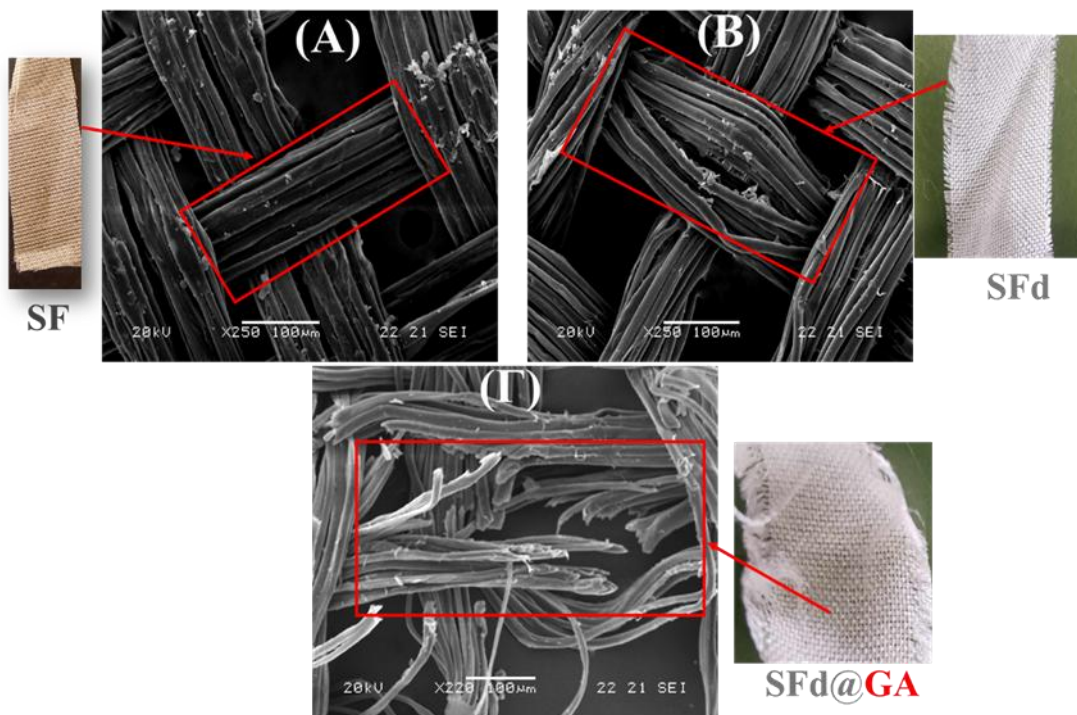


Εικόνα 3-17. Συνθετική πορεία της ακινητοποίησης του γαλλικού οξέος στην επιφάνεια του SFd@NH₂ και της δημιουργίας του υβριδικού υλικού SFd@GA.

3.1.10. Χαρακτηρισμός του υβριδικού υλικού SFd@GA

3.1.10.1. Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (SEM)

Οι μικρογραφίες SEM που απεικονίζουν το φυσικό μετάξι, το αποκομμιωμένο μετάξι (SFd) και το υβριδικό υλικό του μεταξιού που είναι εμβολιασμένο με γαλλικό οξύ (GA) (SFd@GA) παρουσιάζονται στην (Εικόνα 3-18). Ειδικότερα, οι εικόνες SEM αποκαλύπτουν ότι η δομική ακεραιότητα των ινών του μεταξιού διατηρείται σε σημαντικό βαθμό, με τις μεμονωμένες ίνες να παρουσιάζουν κυλινδρική μορφολογία, διατηρώντας παράλληλα ένα μερικώς διατηρούμενο τρισδιάστατο μοτίβο ύφανσης.



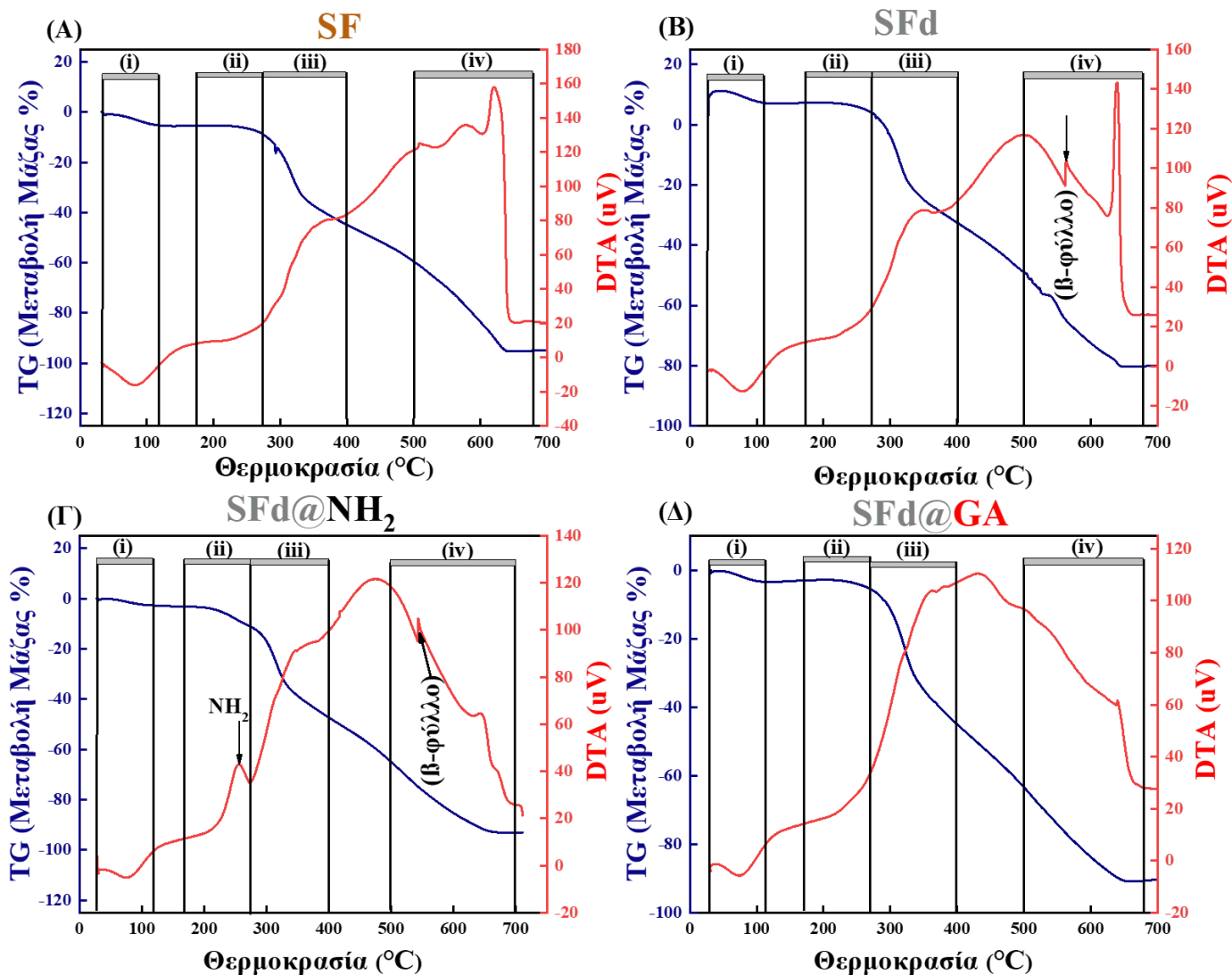
Εικόνα 3-18. Οι μικρογραφίες SEM των υλικών: (Α) SF (φυσικό μετάξι), (Β) SFd (αποκομμωμένο μετάξι) και (Γ) SFd@GA (SFd που έχει τροποποιηθεί με γαλλικό οξύ).

Είναι αξιοσημείωτο ότι στη φωτογραφία SEM του υλικού με ακινητοποιημένο γαλλικό οξύ (SFd@GA), οι ίνες παρουσιάζουν πιο έντονα σημάδια φθοράς και υποβάθμισης, ενδεικτικά της παρατεταμένης επεξεργασίας που υπέστη το υλικό κατά την επιφανειακή τροποποίησή του.

3.1.10.2. Θερμοσταθμική Διαφορική Θερμική Ανάλυση (TG-DTA)

Παρακάτω απεικονίζονται τα δεδομένα της Θερμοσταθμικής-Διαφορικής Θερμικής Ανάλυσης (TG-DTA) για το μη επεξεργασμένο μετάξι (SF), το αποκομμωμένο μετάξι (SFd), το μετάξι SFd με τερματικές αμινομάδες (SFd@NH₂) και το τελικό υβριδικό υλικό SFd@GA, όπου το γαλλικό οξύ εμβολιάζεται στην επιφάνεια του άμινο τροποποιημένου υλικού SFd@NH₂ (**Εικόνα 3-19**). Για την ανάλυση του μεταξιού χρησιμοποιήθηκε δείγμα μάζας περίπου 10-11 mg και οι θερμικές μετρήσεις διεξήχθησαν σε εύρος θερμοκρασιών από 20 °C έως 700 °C, με ρυθμό θέρμανσης 10 °C/min υπό συνθήκες ροής συνθετικού αέρα. Η θερμοσταθμική (TG) και η Διαφορική Θερμική Ανάλυση (DTA) διεξήχθησαν ταυτόχρονα στο πλαίσιο μιας ενιαίας πειραματικής διάταξης²³⁵.

Τα θερμογράφημα των υλικών SF, SFd και SFd@NH₂ έχουν αναλυθεί λεπτομερώς στην Ενότητα 3.1.4.1. Το θερμογράφημα του SFd@NH₂ απεικονίζεται στην **Εικόνα 3-19 Α**, όπου η παρουσία μιας εξώθερμης καμπύλης DTA (κόκκινη γραμμή) ταυτόχρονα με την καύση του υφάσματος SFd@NH₂ υποδηλώνει αυξημένη θερμική ευαισθησία σε σύγκριση με το λιγότερο επεξεργασμένο υλικό SFd ή το άθικτο υλικό SF (**Εικόνα 3-19 Α,Β**). Στην **Εικόνα 3-19 Γ**, η εμφάνιση μιας εξώθερμης κορυφής DTA στην περιοχή θερμοκρασιών 250-300 °C, που προηγουμένως δεν είχε ανιχνευθεί στο SFd ή στο SF, αποδίδεται στην αποδόμηση των εμβολιασμένων λειτουργικών ομάδων NH₂ στο SFd@NH₂. Η αθροιστική απώλεια μάζας του SFd@NH₂ μεταξύ 200°C και 400°C αντιστοιχεί κυρίως στην αποσύνθεση των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων καθώς και στα εμβολιασμένα τμήματα προπυλο-αμίνης, αντιπροσωπεύοντας 43.8% της συνολικής απώλειας. Λαμβάνοντας υπόψη ότι το συνολικό ποσοστό απώλειας μάζας που παρουσιάζει το SFd στην περιοχή 200-400°C ανέρχεται σε 39.6%, η εναπομένουσα διαφορά 4.2% μπορεί να αποδοθεί στην παρουσία των ομάδων H₂N(CH₂)₃-. Αυτό ισοδυναμεί με περίπου 0.73 mmol εμβολιασμένων αμινομάδων ανά γραμμάριο SFd@NH₂. Η απώλεια μάζας που παρουσιάζει το SFd@GA στην ίδια περιοχή θερμοκρασιών (**Εικόνα 3-19 Δ**) ανέρχεται σε 50.1%. Αφαιρώντας το 43.8% που αποδίδεται στο SFd@NH₂, υπολείπεται 6.3%, που προέρχεται κυρίως από την καύση του γαλλικού οξέος. Αυτό αντιστοιχεί σε περίπου 0.41 mmol εμβολιασμένου γαλλικού οξέος ανά γραμμάριο SFd@GA. Το θερμογράφημα του SFd@GA (**Εικόνα 3-19 Δ**) απεικονίζει εξώθερμες μεταβάσεις που αποδίδονται στην προοδευτική αποδόμηση του οργανικού υλικού. Σημειώνεται ότι η κορυφή που εντοπίζεται στους 250-300 °C στο θερμογράφημα SFd@NH₂ και αποδίδεται στην καύση των εμβολιασμένων αμινομάδων (**Εικόνα 3-19 Γ**), απουσιάζει στο θερμογράφημα του SFd@GA λόγω της σύζευξης των αμινομάδων με το γαλλικό οξύ.



Εικόνα 3-19. Η θερμοσταθμική (TG) και η διαφορική θερμική ανάλυση (DTA) διεξήχθησαν σε δείγματα: (A) SF, (B) SFd, (Γ) SFd@NH₂, (Δ) SFd@GA. Τα διακριτά στάδια (i), (ii), (iii) και (iv) τις θερμοσταθμικές καμπύλες αντιστοιχούν στις διαδοχικές διεργασίες: (i) εκρόφιση προσροφημένων μορίων νερού, (ii) απελευθέρωση πτητικών συστατικών, (iii) διάσπαση των πλευρικών αλυσίδων αμινοξέων και εμβολιασμένων ομάδων και (iv) πλήρης αποικοδόμηση των πρωτεϊνών μεταξιού.

Τα συνολικά δεδομένα TG/DTA που παρουσιάζονται εδώ αποδεικνύουν ισχυρά τον επιτυχή εμβολιασμό του γαλλικού οξέος πάνω στο SFd@NH₂ μέσω των λειτουργικών ομάδων NH₂. Αυτή η παρατηρούμενη χημική επιφανειακή τροποποίηση συνάδει με την τυπική ακινητοποίηση του

γαλλικού οξέος σε επιφάνεια σίλικα που φέρει λειτουργικές αμινομάδες, όπως καταδείχθηκε σε προηγούμενη εργασία μας που περιγράφει την ακινητοποίηση του γαλλικού οξέος σε μήτρα $\text{SiO}_2@\text{NH}_2$ ⁸⁷.

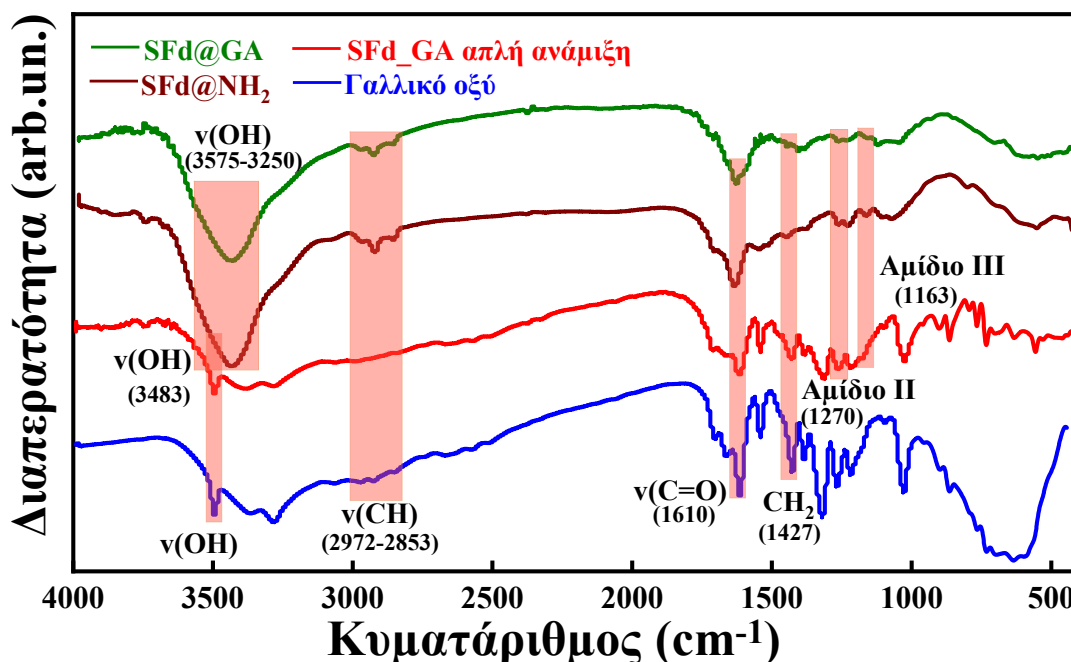
3.1.10.3. Φασματοσκοπία FT-IR

Στην **Εικόνα 3-20** απεικονίζεται το φάσμα FTIR του υλικού SFd@GA. Για σύγκριση, απεικονίζονται επίσης τα αντίστοιχα φάσματα του SFd@NH₂, του γαλλικού οξέος και ενός μίγματος {SFd και γαλλικού οξέος}. Όπως παρατηρήθηκε, στο φάσμα του γαλλικού οξέος (GA), εμφανίζονται εξέχουσες κορυφές στα 3493, 3368 και 3281 cm⁻¹, που προέρχονται από δονήσεις των δεσμών ν(OH). Επιπλέον, οι κορυφές που ανιχνεύονται στα 2971 cm⁻¹, 2922 cm⁻¹ και 2850 cm⁻¹ συνδέονται με τις δονήσεις τάσης των δεσμών (CH-OH) εντός του γαλλικού οξέος. Η ανίχνευση των δονήσεων που προκαλούνται από τους δεσμούς ν(C=O) εντοπίζεται στα 1618 cm⁻¹. Τέλος, η παρουσία δεσμών CH₂ πιστοποιείται από τις κορυφές που παρατηρούνται στα 1425, 1327, 1266 και 1211 cm⁻¹ ⁸⁷.

Τα φάσματα FT-IR για τα υλικά SF, SFd και SFd@NH₂ αναλύθηκαν εκτενώς πιο πάνω στην παρούσα εργασία. Στο φάσμα FT-IR του μείγματος SFd και GA, όπου χρησιμοποιήθηκε SFd κορεσμένο με διάλυμα γαλλικού οξέος/μεθανόλης, διακρίνονται εξέχουσες κορυφές στα 3493, 3392 και 3276 cm⁻¹, που αποδίδονται σε δονήσεις τάσης των δεσμών ν(OH). Επιπλέον, οι κορυφές που παρατηρούνται στα 2986, 2929 και 2829 cm⁻¹ δηλώνουν δονήσεις τάσης των δεσμών (C-H) του μείγματος. Ειδικότερα, η κορυφή στα 1640 cm⁻¹ φαίνεται να υφίσταται μετατόπιση σε σύγκριση με εκείνη του γαλλικού οξέος (1618 cm⁻¹). Επιπλέον, η παρουσία αμιδικών δεσμών, ιδίως των Αμιδίων I, II και III, υποδεικνύεται από τις κορυφές στα 1625, 1430 και 1257 cm⁻¹, αντίστοιχα ²⁰². Οι κορυφές που παρατηρούνται στα 1381, 1255 και 1218 cm⁻¹ μπορούν να αποδοθούν σε δεσμούς CH₂, παρουσιάζοντας διακριτή μετατόπιση σε σύγκριση με εκείνες που παρατηρούνται στο γαλλικό οξύ ^{87,177}. Σημειώνεται ότι οι οξείες κορυφές που είναι εμφανείς σε αυτό το φάσμα προέρχονται από το γαλλικό οξύ (GA) που είναι σε επαφή με διαβρεγμένο με μεθανόλη μετάξι.

Συγκριτικά, το φάσμα FT-IR του υλικού SFd@GA, όταν αντιπαραβάλλεται με αυτό του απλού μείγματος {SFd+GA} (όπως απεικονίζεται στην **Εικόνα 3-20**), εμφανίζεται ευρύτερο,

υποδεικνύοντας λιγότερες αιχμηρές κορυφές και αποκλείοντας την παρουσία ελεύθερου GA. Επιπλέον, παρατηρείται μια κυρίαρχη ευρεία κορυφή στα 3429 cm^{-1} , η οποία υποδηλώνει την παρουσία δονήσεων που προκαλούνται από τους δεσμούς (O-H). Επιπλέον, οι κορυφές που ανιχνεύονται στα 2969 cm^{-1} , 2926 cm^{-1} και 2853 cm^{-1} συνδέονται με δονήσεις που προκαλούνται από τις δονήσεις των δεσμών (CH-OH). Αξίζει να σημειωθεί ότι η κορυφή στα 1636 cm^{-1} παρουσιάζει μια αξιοσημείωτη μετατόπιση σε σύγκριση με εκείνη του καθαρού γαλλικού οξέος (1618 cm^{-1}), καθώς και μια σαφή απόκλιση από εκείνη του SFd@NH₂ και του απλού μείγματος SFd-GA (1640 cm^{-1}) παρουσιάζουν διαφορετικό προφίλ (Εικόνα 3-20). Η παρατήρηση αυτή υποδηλώνει τον εμβολιασμό του γαλλικού οξέος στο μετάξι. Επιπλέον, οι κορυφές που ανιχνεύονται στα 1625 cm^{-1} , 1430 cm^{-1} και 1257 cm^{-1} αποδίδονται σε ύπαρξη αμιδικών δεσμών και συγκεκριμένα του Αμίδιο I, II και III, αντίστοιχα. Τέλος, αναδύεται μια κορυφή στα 1168 cm^{-1} , η οποία αποδίδεται στην ύπαρξη της δόνησης του δεσμού $\nu(\text{C-O})$.

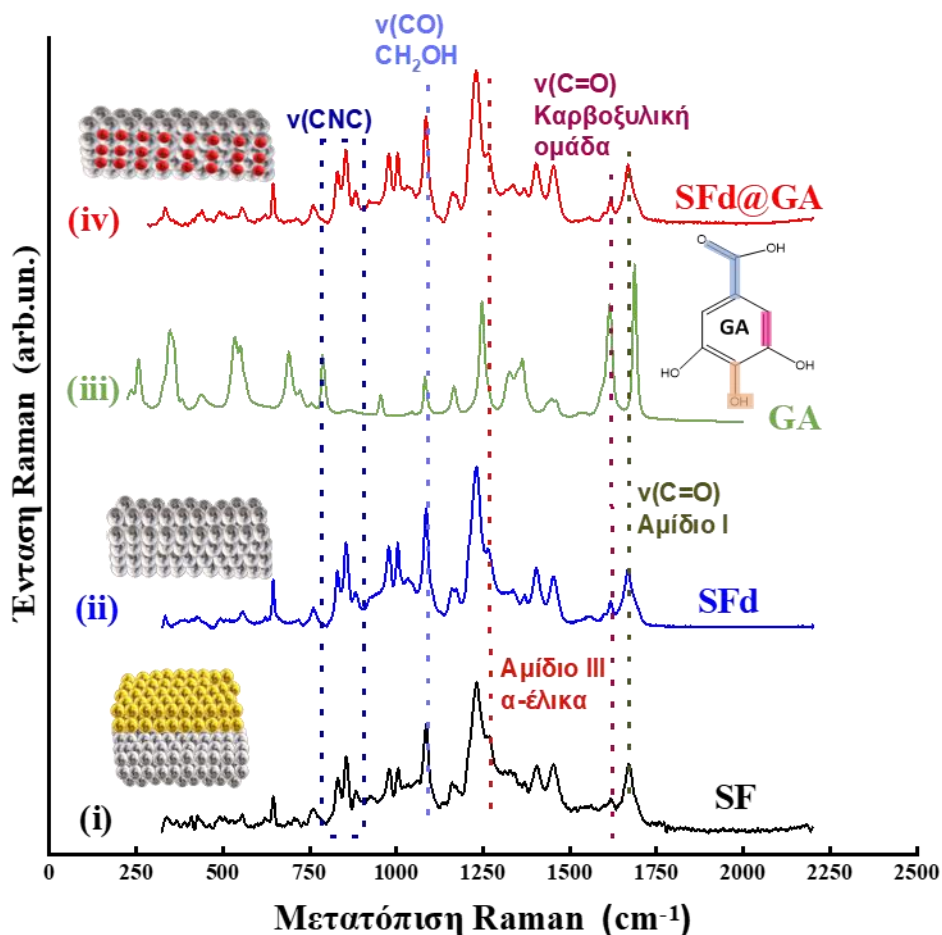


Εικόνα 3-20. Παρουσιάζονται τα φάσματα FT-IR για τα υλικά SFd@GA, SFd@NH₂, του μείγματος SFd-GA και σκόνης γαλλικού οξέος.

3.1.10.4. Φασματοσκοπία Raman

Το φάσμα Raman της σκόνης γαλλικού οξέος απεικονίζεται στην **Εικόνα 3-21** (iii) (πράσινη γραμμή). Η διακριτή κορυφή που παρατηρείται στα 1688 cm^{-1} μπορεί να αποδοθεί με βεβαιότητα στη δόνηση του δεσμού $\nu(\text{C}=\text{O})$ της αρωματικής όξινης ομάδας και συγκεκριμένα στην ομάδα ($\text{Ar}-\text{COOH}$). Μια άλλη αξιοσημείωτη κορυφή είναι εμφανής στα 1618 cm^{-1} που αποδίδεται στις ταλαντώσεις του διπλού δεσμού άνθρακα-άνθρακα (ν) ($\text{C}=\text{C}$). Επιπλέον, εμφανίζεται μια ευδιάκριτη κορυφή στα 1250 cm^{-1} , ενδεικτική της παρουσίας δονήσεων τετρώματος δεσμών καρβονυλίου $\nu(\text{C}=\text{O})$. Επιπρόσθετα, η εμφάνιση της κορυφής στα 1097 cm^{-1} μπορεί να αποδοθεί στις δονήσεις τάσης του δεσμού άνθρακα-οξυγόνου $\nu(\text{C}-\text{O})$, που προέρχονται από την καρβοξυλομάδα του γαλλικού οξέος (GA). Τέλος, στα 690 cm^{-1} , εντοπίζεται μια ευρεία κορυφή που προέρχεται από τις εκτός επιπέδου δονήσεις κάμψης των ομάδων υδροξυλίου ($\text{O}-\text{H}$)^{268,269}. Τα φάσματα Raman για τα υλικά SF, SFd και SFd@NH₂ αναλύθηκαν εκτενώς πιο πάνω.

Στην **Εικόνα 3-21** (iv) η κόκκινη γραμμή, απεικονίζει το φάσμα Raman του SFd@GA, όπου παρατηρείται μια ισχυρή κορυφή στα 1695 cm^{-1} , ενδεικτική της δόνησης του δεσμού άνθρακα-οξυγόνου ($\text{C}=\text{O}$) και αποκαλυπτική της παρουσίας Αμιδίου-I. Επιπλέον, οι διακριτές κορυφές που παρατηρούνται στα 1615 cm^{-1} μπορούν να αποδοθούν σε δονήσεις καρβονυλικών δεσμών ($\text{C}=\text{O}$), που προέρχονται τόσο από πρωτεϊνικούς αμιδικούς δεσμούς όσο και από την ομάδα $\text{C}=\text{O}$ της καρβοξυλικής ομάδας του γαλλικού οξέος. Επιπλέον, οι συμμετρικές δονήσεις τετρώματος του τμήματος άνθρακα-αζώτου-άνθρακα $\nu(\text{CNC})$ συμβάλλουν στη δημιουργία των κορυφών που παρατηρούνται στα 829 , 887 και 859 cm^{-1} ²⁶⁷. Επιπλέον, η κορυφή που ανιχνεύεται στα 1083 cm^{-1} αντιστοιχεί στην δόνηση τετρώματος του δεσμού άνθρακα-οξυγόνου $\nu(\text{CO})$ της ομάδας CH_2OH . Οι κορυφές που εμφανίζονται στη φασματική περιοχή από 1300 μέχρι 1270 cm^{-1} μπορούν να αποδοθούν στην παρουσία του Αμιδίου-III, που συνήθως συνδέεται με τη διαμόρφωση α -έλικας^{268,269}.



Εικόνα 3-21. Φάσματα Raman για (i) μη επεξεργασμένο μετάξι(SF), (ii) SFd, (iii) σκόνη γαλλικού οξέος και (iv) SFd@GA.

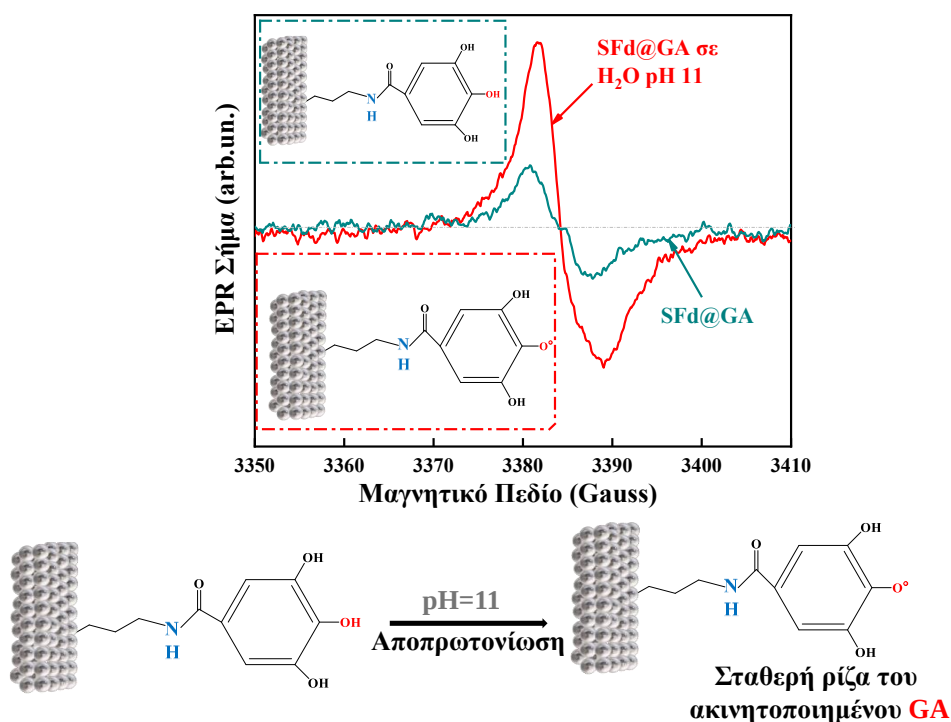
Συνοψίζοντας, οι συνολικές φασματοσκοπικές αναλύσεις FTIR και Raman, μαζί με τα δεδομένα θερμικής ανάλυσης, επικυρώνουν τον αποτελεσματικό ομοιοπολικό εμβολιασμό του γαλλικού οξέος πάνω στο SFd, σχηματίζοντας το υβριδικό υλικό SFd@GA. Επιτεύχθηκε μια αξιοσημείωτη φόρτιση γαλλικού οξέος (GA), περίπου 6% κατά βάρος. Στο υβριδικό υλικό SFd@GA, η συνθετική πορεία ακινητοποίησης προχωρά μέσω της δημιουργίας πεπτιδικού δεσμού μεταξύ της καρβοξυλομάδας του GA και των εμβολιασμένων αμινομάδων ($-NH_2$) στο SFd. Αυτό διευκρινίζει μια κρίσιμη πτυχή, υποδηλώνοντας ότι οι φαινολικές υδροξυλ ομάδες (OH) του γαλλικού δεν εμπλέκονται στη διαδικασία ακινητοποίησης και δημιουργίας του υβριδικού υλικού SFd@GA. Ως εκ τούτου, όπως καταδεικνύεται στις επόμενες ενότητες, οι ομάδες υδροξυλίου (OH) που υπάρχουν στα υλικά SFd@GA είναι διαθέσιμες και ικανές να λειτουργούν συμμετέχοντας σε αντιοξειδωτική Μεταφορά-Ατόμων-Υδρογόνου (HAT).

3.1.10.5. Φασματοσκοπία Ηλεκτρονικού Παραμαγνητικού Συντονισμού (EPR)

Ένα βασικό χαρακτηριστικό του γαλλικού οξέος (GA) έγκειται στην ικανότητά του να δημιουργεί σταθερές ρίζες μέσω αλληλεπιδράσεων με τις ομάδες υδροξυλίου (OH)^{23,270}. Όπως αποδείχθηκε σε προηγούμενη δουλειά του εργαστηρίου μας στην περίπτωση σύνθεσης του SiO₂@GA, η διατήρηση της ακεραιότητας των τμημάτων υδροξυλίου (-OH) καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας εμβολιασμού επιβεβαιώνεται από την ικανότητα του ακινητοποιημένου γαλλικού οξέος να παράγει σταθερές ρίζες κατά την αποπρωτονίωση και την οξείδωση των ομάδων υδροξυλίου από το ατμοσφαιρικό οξυγόνο (O₂)²⁷⁰. Αυτή η προϋπόθεση υπογραμμίζει την ικανότητά του να συμμετέχει σε αντιοξειδωτικές αντιδράσεις Μεταφοράς Ατόμων Υδρογόνου (HAT)¹⁰⁶. Σε αυτό το πλαίσιο, η ικανότητα του γαλλικού οξέος (GA) που είναι ακινητοποιημένο σε μετάξι να προκαλεί το σχηματισμό ριζών, παρακολουθήθηκε με τη χρήση Ηλεκτρονικού Παραμαγνητικού Συντονισμού (EPR- Electron Paramagnetic Resonance), όπως απεικονίζεται στην **Εικόνα 3-22**. Το υλικό SFd@GA, στη μορφή στεγνού μεταξιού, παρουσιάζει ένα διακριτό, αν και ασθενές σήμα ριζών GA. Το πιο σημαντικό είναι ότι μετά την προεπεξεργασία της ίνας SFd@GA σε υδατικό αλκαλικό περιβάλλον (pH 11) και την επακόλουθη έκθεσή της σε ατμοσφαιρικό οξυγόνο για διάρκεια 20 λεπτών, διακρίνεται εύκολα το χαρακτηριστικό σήμα EPR που αντιστοιχεί σε ρίζες γαλλικού οξέος (GA) με τιμή $g=2,0040$ (**Εικόνα 3-22**, κόκκινη γραμμή), σύμφωνα με προηγούμενα βιβλιογραφικά δεδομένα^{106,132,270}. Η ποσοτική ανάλυση των ριζών γαλλικού οξέος (GA) μέσω σημάτων EPR αποκαλύπτει το σχηματισμό 0.044 μmol ριζών γαλλικού οξέος ανά γραμμάριο ίνας SFd@GA. Σύμφωνα με τον **Πίνακα 3-1** και λαμβάνοντας υπόψη τα δεδομένα της θερμοσταθμικής ανάλυσης (TGA) για το υβριδικό υλικό SFd@GA τα οποία υποδεικνύουν 410 μmol εμβολιασμένου γαλλικού οξέος (GA) ανά γραμμάριο ίνας SFd@GA, τα ευρήματα του EPR υποδηλώνουν ότι μόνο το 0.01% της ποσότητας του ακινητοποιημένου γαλλικού οξέος είναι ικανό να παράγει σταθερές ρίζες σε συνθήκες περιβαλλοντικού οξυγόνου.

Η παρατήρηση αυτή υποδεικνύει ότι τα μόρια γαλλικού οξέος (GA) που υπάρχουν στο υβριδικό υλικό SFd@GA δεν είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στην οξείδωση υπό συνθήκες περιβαλλοντικού οξυγόνου, οδηγώντας στον περιορισμένο σχηματισμό σταθερών ριζών. Η διαπίστωση αυτή έχει ιδιαίτερη σημασία, καθώς ο σχηματισμός σταθερών ριζών από το γαλλικό οξύ αντιπροσωπεύει μια ανεπιθύμητη διαδικασία, η οποία έρχεται σε αντίθεση με την προσβασιμότητα των ομάδων υδροξυλίου (-OH) που απαιτούνται για αντιοξειδωτική δράση

^{106,132,270}. Για παράδειγμα, όπως έχει αποδειχθεί σε προηγούμενη δουλειά του εργαστηρίου μας, η ακινητοποίηση του γαλλικού οξέος (GA) σε μια στερεή μήτρα, όπως η SiO₂¹⁰⁶, ενισχύει την αντιοξειδωτική δράση του GA. Η διαδικασία αυτή καταστέλλει αποτελεσματικά τον σχηματισμό ριζών του γαλλικού οξέος και μετριάξει τον επακόλουθο πολυμερισμό τους, ο οποίος συχνά αποδεικνύεται από την εμφάνιση καφέ χρώματος. Εδώ, το παρόν σύνολο δεδομένων επιβεβαιώνει την πλεονεκτική επίδραση της μήτρας μεταξιού στη διατήρηση της λειτουργικότητας των ομάδων υδροξυλίου του γαλλικού οξέος (GA-OH). Επιπλέον, μετριάξει την εμφάνιση καφε-μαύρου χρωματισμού στο ύφασμα, ο οποίος συνήθως συνδέεται με τον πολυμερισμό του γαλλικού οξέος. Παρακάτω παρουσιάζεται σχηματικά η αποπρωτονίωση του ακινητοποιημένου γαλλικού οξέος και ο σχηματισμός ρίζας με συμβολή του ακινητοποιημένου γαλλικού οξέος.



Εικόνα 3-22. Απεικονίζονται τα φάσματα ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού (EPR) του υλικού SFd@GA (κυανή γραμμή) και του υλικού SFd@GA που υποβλήθηκε σε κατεργασία σε υδατικό αλκαλικό περιβάλλον (pH 11) (κόκκινη γραμμή).

Πίνακας 3-1. Χαρακτηριστικά φόρτωσης γαλλικού οξέος στο υβριδικό υλικό SFd@GA και της ρίζας του ακινητοποιημένου GA.

<i>Υλικό</i>	<i>Ποσότητα φόρτωσης GA [μmoles γαλλικού οξέος ανά γραμμάριο υλικού] (±20)</i>	<i>Σταθερές ρίζες γαλλικού οξέος* [μmoles ριζών γαλλικού οξέος ανά γραμμάριο υλικού] (±0.5x10⁻³)</i>
<i>SFd@GA</i>	410	44x10 ⁻³

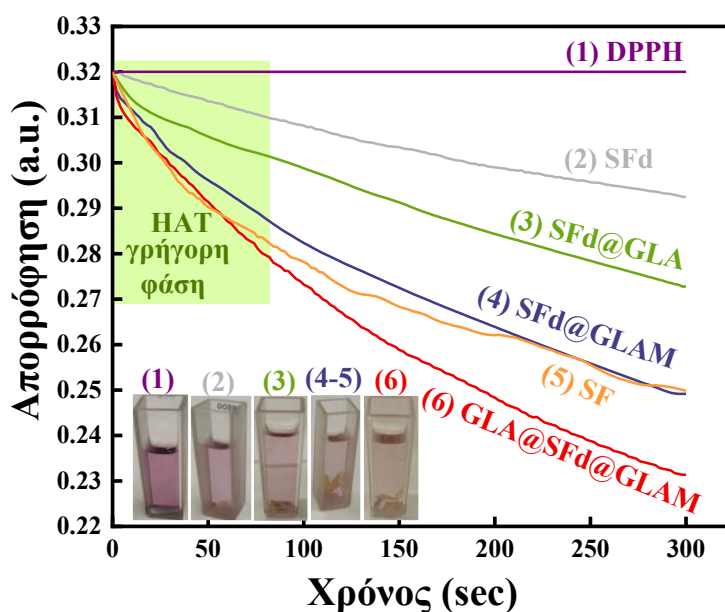
* μέγιστο των ριζών GA που σχηματίζονται κατά την έκθεση του SFd@GA σε H₂O σε pH=11 κάτω από ατμοσφαιρικό αέρα.

**Κεφάλαιο 3: Δεύτερο Μέρος : Αξιολόγηση
Αντιοξειδωτικής Δράσης των υβριδικών υλικών
SFd@GLA, SFd@GLAM, GLA@SFd@GLAM
και SFd@GA, μέσω μηχανισμού HAT (Hydrogen
Atom Transfer)**

3.2. Αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης των υβριδικών υλικών του μεταξιού, έναντι των ριζών DPPH

3.2.1. Αξιολόγηση της ικανότητας εξουδετέρωσης των ριζών DPPH από τα υβριδικά υλικά, παράγωγα του υαλουρονικού οξέος: SFd@GLA, SFd@GLAM και GLA@SFd@GLAM

Η αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης των υλικών της παρούσας διατριβής πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο DPPH. Αυτό περιλάμβανε την παρακολούθηση της χρονικής εξέλιξης του φάσματος ορατού της ρίζας DPPH σε διάλυμα μεθανόλης κατά τη διάρκεια της αλληλεπίδρασής της με το αντιοξειδωτικό^{87,132,237}. Η ρίζα DPPH εμφανίζει μια κυρίαρχη κορυφή στα 515 nm, η οποία χαρακτηρίζεται από τη βιολετί απόχρωσή της, όπως απεικονίζεται στην **Εικόνα 3-23**. Κατά τη διερεύνηση της δραστηριότητας των υλικών με βάση το μετάξι, ένα τμήμα μεταξιού τοποθετείται στη βάση της κυψελίδας, ενώ το μεθανολικό διάλυμα που περιέχει DPPH εισάγεται επιτόπου στο θάλαμο του οργάνου Υπεριώδους-Ορατού. Στη συνέχεια, παρακολουθείται συνεχώς η χρονική εξέλιξη της απορρόφησης DPPH στα 515 nm.



Εικόνα 3-23. Κινητική της αντιοξειδωτικής ικανότητας μεταφοράς ατόμων υδρογόνου (HAT) του αποκομμιωμένου μεταξωτού υφάσματος-SFd, του ακατέργαστου μεταξιού (SF) και των υβριδικών υλικών SFd@GLA, SFd@GLAM καθώς και του διπλά εμβολιασμένου GLA@SFd@GLAM με τη μέθοδο DPPH.

Πιο συγκεκριμένα στον πάτο της κυψελίδας που περιέχει μεθανολικό διάλυμα DPPH συγκέντρωσης 30μM τελικού όγκου 3ml τοποθετείται μια μικρή ποσότητα υφάσματος περίπου 5mg. Αμέσως μετά η κυψελίδα τοποθετείται στο φασματοφωτόμετρο UV-Vis και καταγράφεται η κινητική καμπύλη της απορρόφησης σε σχέση με το χρόνο, η οποία υποδηλώνει το πόσο γρήγορα και πόσο καλά αλληλεπιδρά το αντιοξειδωτικό με τη ρίζα DPPH. Με την προσθήκη του αντιοξειδωτικού παρατηρείται μείωση της έντασης της κορυφής του DPPH στα 515nm σε συνάρτηση με το χρόνο. Όσο πιο απότομη είναι μείωση της έντασης της κορυφής, τόσο πιο ισχυρό είναι το αντιοξειδωτικό. Για τον προσδιορισμό και τον υπολογισμό της κινητικής των αντιδράσεων πρέπει να απομονώνεται το κάθε φάσμα ξεχωριστά και να υπολογίζεται ο αριθμός των ριζών που εξουδετερώνονται. Η εξίσωση που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό των ριζών DPPH που εξουδετερώνονται ανά γραμμάριο αντιοξειδωτικό αναλύεται με λεπτομέρεια στη συνέχεια.

Τα δεδομένα που παρουσιάζονται στην **Εικόνα 3-23** δείχνουν ότι τα υβριδικά υλικά SFd@GLA και SFd@GLAM επιδεικνύουν σχετικά χαμηλή αντιοξειδωτική δράση έναντι της ρίζας DPPH. Η τάση αυτή συνάδει με προηγούμενη μελέτη μας, όπου τα μονομερή GLA και GLAM παρουσίασαν αμελητέα αντιοξειδωτική δράση έναντι της ρίζας DPPH ⁸⁷. Το SFd παρουσιάζει πολύ μικρή αντιοξειδωτική ικανότητα, περίπου τη μισή από εκείνη του μη επεξεργασμένου μεταξιού (SF). Αντίθετα, το διπλά εμβολιασμένο υβριδικό υλικό GLA@SFd@GLAM με μοριακή αναλογία [GLA:GLAM] [2:1] παρουσιάζει πολύ υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση σε σύγκριση με τα SFd@GLA και SFd@GLAM. Σημειώνεται, ότι όλα τα υβριδικά υλικά επιδεικνύουν αυξημένη αντιοξειδωτική δραστηριότητα σε σύγκριση με το αποκομμιωμένο μετάξι. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι ο συν-εμβολιασμός τόσο του GLA όσο και του GLAM στο SFd φαίνεται να έχει ιδιαίτερα ευεργετική επίδραση στην αποτελεσματικότητα της μεταφοράς ατόμων υδρογόνου (HAT) προς τις ρίζες DPPH.

Συνολικά, όπως απεικονίζεται στην **Εικόνα 3-23**, τα υβριδικά υλικά SFd@GLA και SFd@GLAM παρουσιάζουν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση σε σύγκριση με το SFd, αν και κατώτερη από το SF. Όταν τα μονομερή GLA και GLAM συν-ακινητοποιούνται στο ίδιο υλικό SFd, ενισχύουν συνεργιστικά την αντιοξειδωτική δράση του υλικού. Κατά συνέπεια, το διπλά εμβολιασμένο υβριδικό υλικό GLA@SFd@GLAM με μοριακή αναλογία [GLA:GLAM] [2:1] εμφανίζει υψηλότερη αντιοξειδωτική αποτελεσματικότητα σε σύγκριση τόσο με το SFd όσο και

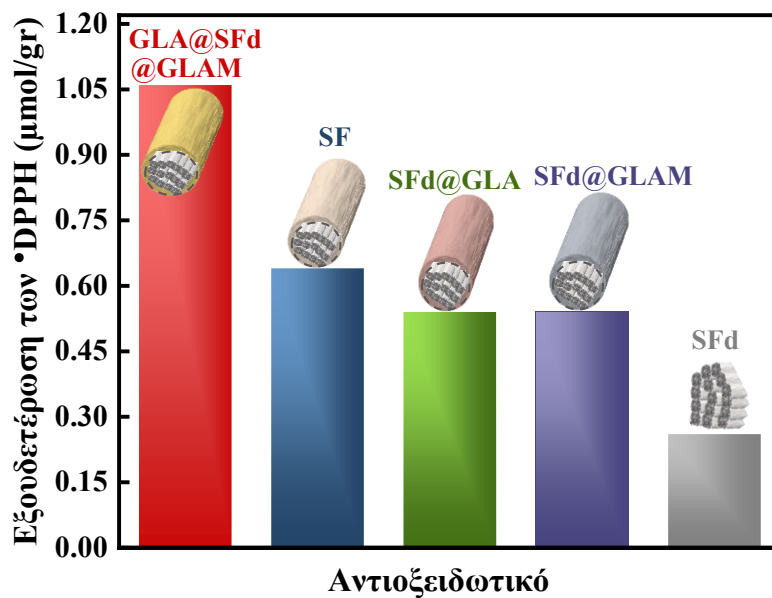
με το ακατέργαστο SF. Ως εκ τούτου, η κατάταξη των υλικών με βάση αύξουσα αντιοξειδωτική δραστηριότητα έχει ως εξής:

$$\text{SFd} < \text{SFd@GLA} \approx \text{SFd@GLAM} < \text{SF} < \text{GLA@SFd@GLAM}.$$

Η παρατηρούμενη αντιοξειδωτική δράση ως προς τις ρίζες DPPH εμφανίζεται μέσω του μηχανισμού μεταφοράς ατόμων υδρογόνου (Hydrogen Atom Transfer - HAT) ⁷⁹, όπου η ταυτόχρονη μεταφορά τόσο του πρωτονίου όσο και του ηλεκτρονίου πραγματοποιείται μεταξύ του ίδιου δότη και του ίδιου αποδέκτη ⁸⁴. Με την προσφορά ενός ατόμου υδρογόνου το αντιοξειδωτικό μετατρέπεται το ίδιο σε ρίζα, ενώ η ρίζα του DPPH με την αποδοχή του ατόμου υδρογόνου μετατρέπεται στη σταθερή μορφή της υδραζίνης DPPH-H. Η εξίσωση Lambert-Beer (**Εξίσωση 3-1**) χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση των ριζών DPPH που εξουδετερώνονται από τα υλικά με βάση το μετάξι ²⁷¹.

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad (\text{Εξίσωση 3-1})$$

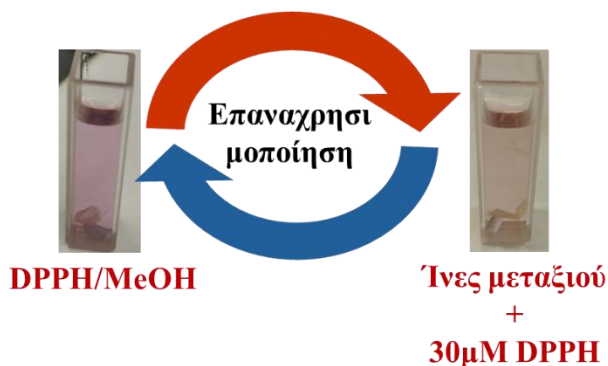
Σε αυτή την εξίσωση, το A δηλώνει την απορρόφηση στα 515 nm, το ε τον μοριακό συντελεστή απόσβεσης του DPPH στη μεθανόλη ($\varepsilon = 1.09 \cdot 10^4$) ¹⁰⁶, το c τη συγκέντρωση του DPPH και το l το πάχος του δείγματος (με $l = 1$ cm). Χρησιμοποιώντας την προαναφερθείσα εξίσωση, υπολογίστηκε ο αριθμός μmol των ριζών DPPH που εξουδετερώθηκαν ανά γραμμάριο υλικών ινών μεταξύ: 0.26 $\mu\text{mol DPPH/gr SFd}$, 0.54 $\mu\text{mol DPPH/gr SFd@GLA}$, 0.54 $\mu\text{mol DPPH/gr SFd@GLAM}$, 0.64 $\mu\text{mol DPPH/gr SF}$ και τέλος 1.06 $\mu\text{mol DPPH/gr GLA@SFd@GLAM}$ (**Εικόνα 3-24**).



Εικόνα 3-24. Μπαρόγραμμα που δείχνει την ποσότητα των ριζών DPPH που εξουδετερώθηκε ανά γραμμάριο μεταξωτού υλικού, SFd, SFd@GLA, SFd@GLAM, SF και GLA@SFd@GLAM.

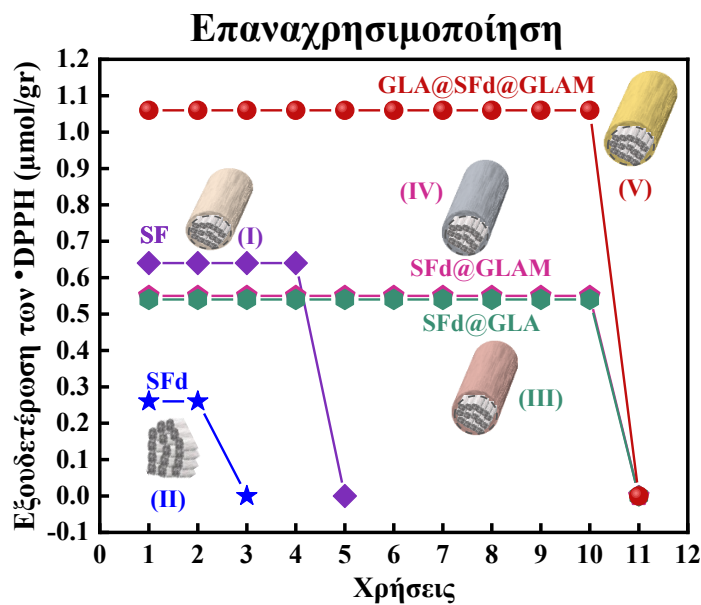
3.2.2. Δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης ως αντιοξειδωτικά των υβριδικών υλικών SFd@GLA, SFd@GLAM και του διπλά εμβολιασμένου GLA@SFd@GLAM

Μετά την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης των υβριδικών μεταξωτών υλικών, διεξήχθη έρευνα για την αξιολόγηση της δυνατότητας επαναχρησιμοποίησής τους ως αντιοξειδωτικά έναντι των ριζών DPPH. Έτσι, μετά την αρχική αντίδραση ενός κομματιού μη επεξεργασμένου μεταξιού με το διάλυμα DPPH, αυτό απομακρύνθηκε από την κυψελίδα και αφέθηκε για λίγο στον αέρα να στεγνώσει, περίπου 2 λεπτά. Στη συνέχεια, το ίδιο μετάξι τοποθετήθηκε ξανά στον πυθμένα της κυψελίδας και αντέδρασε με νέο μεθανολικό διάλυμα DPPH (Εικόνα 3-25). Η ίδια διαδικασία επαναλαμβανόταν μέχρι να παρουσιαστεί οποιαδήποτε αλλαγή στο κινητικό προφίλ των υλικών του μεταξιού.



Εικόνα 3-25. Το πανί, μετά την πρώτη χρήση και αφού στεγνώσει για δύο λεπτά υπό ατμοσφαιρικό αέρα ξαναχρησιμοποιείται. Αυτό εφαρμόστηκε για τα υβριδικά υλικά SFd@GLA, SFd@GLAM, GLA@SFd@GLAM, καθώς και για το SFd και SF.

Η κινητική που προέκυψε από την επαναχρησιμοποίηση του SF ήταν πανομοιότυπη με την αρχική χρήση, χωρίς να παρουσιάζει καμία διαφορά (**Εικόνα 3-23**). Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε άλλες τέσσερις φορές, με ανάλογα αποτελέσματα. Ωστόσο, κατά την πέμπτη χρήση, η αντιοξειδωτική δράση του ακατέργαστου μεταξιού (SF) μηδενίζεται (**Εικόνα 3-26**). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι το αποκομμιωμένο μετάξι (SFd), από το οποίο έχει αφαιρεθεί η πρωτεΐνη σερίκίνη, μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί μόνο δύο φορές (**Εικόνα 3-26 II**). Τα ίδια πειράματα διεξήχθησαν και για τα υβριδικά υλικά SFd@GLA, SFd@GLAM και GLA@SFd@GLAM. Είναι αξιοσημείωτο ότι όλα τους μπορούν να επαναχρησιμοποιηθούν έως και δέκα φορές χωρίς να παρατηρηθεί καμία μεταβολή στην αντιοξειδωτική τους δράση (**Εικόνα 3-26 III**), (**IV**), (**V**)). Αυτό σημαίνει ότι η ικανότητα επαναχρησιμοποίησής τους ξεπερνά κατά πολύ εκείνη των SF και SFd. Αρχικά, τα SFd@GLA και SFd@GLAM φαίνεται να παρουσιάζουν χαμηλότερη αντιοξειδωτική δράση από το φυσικό μετάξι (SF) όταν χρησιμοποιούνται μία φορά, λαμβάνοντας υπόψη όμως την επαναχρησιμοποίησή τους, συνολικά επιδεικνύουν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική αποτελεσματικότητα από το SF.



Εικόνα 3-26. Διαδοχικές επαναχρησιμοποιήσεις των: SF, SFd, SFd@GLA, SFd@GLAM και του διπλά εμβολιασμένου GLA@SFd@GLAM, πραγματοποιήθηκαν με το ίδιο ύφασμα κάθε φορά, το οποίο αφηνόταν να στεγνώνει στον αέρα για 2 λεπτά σε συνθήκες περιβάλλοντος μεταξύ των χρήσεων του.

Εκτός από την ποσοτικοποίηση των μmol των ριζών DPPH που εξουδετερώθηκαν ανά γραμμάριο υλικού, υπολογίστηκε επίσης η τιμή n_{fast} για τα υβριδικά υλικά SFd@GLA, SFd@GLAM και GLA@SFd@GLAM. Ο υπολογισμός και η εξήγηση της παραμέτρου n_{fast} έχουν αναλυθεί στην Εισαγωγή (Κεφάλαιο 1-6). Το n που αναγράφεται ως στοιχειομετρική αναλογία, ορίζεται ως ο αριθμός των ατόμων υδρογόνου που μεταφέρονται από το αντιοξειδωτικό στη ρίζα DPPH. Στην παρούσα διατριβή εστιάζουμε στο n_{fast} , δηλαδή τη γρήγορη φάση της αντίδρασης που αντιστοιχεί στις ρίζες DPPH που εξουδετερώνονται λόγω της αντίδρασης HAT. Όσο μεγαλύτερο είναι το n_{fast} τόσο καλύτερο είναι το αντιοξειδωτικό.

$$n_{\text{fast}} = \left(\frac{[\text{moles DPPH από HAT}]}{[\text{Αντιοξειδωτικό}]_0} \right)$$

Ο Πίνακας 3-2 παρέχει μια ολοκληρωμένη ανάλυση της ποσότητας των ριζών DPPH που εκκαθαρίζονται ανά γραμμάριο υλικού, μαζί με τις αντίστοιχες τιμές n_{fast} για τα τρία υβριδικά υλικά. Ειδικότερα, ο Πίνακας 3-2 εμφανίζει αποκλειστικά τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την πρώτη χρήση κάθε υλικού.

Με βάση τα αθροιστικά αποτελέσματα που περιγράφονται ανωτέρω, είναι προφανές ότι η μεμονωμένη ακινητοποίηση των μονομερών D-γλουκουρονικού οξέος και N-ακετυλ-D-γλυκοζαμίνης εντός διαφορετικών μητρών SFd προσδίδει υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση σε σύγκριση με το αποκομμιωμένο μετάξι SFd, αν και χαμηλότερη από το φυσικό μετάξι SF. Ωστόσο, κατά τη συν-ακινητοποίηση και των δύο μονομερών εντός της ίδιας μήτρας για το σχηματισμό του διπλά εμβολιασμένου υβριδικού υλικού GLA@SFd@GLAM, παρατηρείται περίπου διπλάσια αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του GLA@SFd@GLAM σε σύγκριση με την ακινητοποίηση των μεμονωμένων μονομερών. Επιπλέον, η ακινητοποίηση των μονομερών GLA και GLAM στην επιφάνεια του μεταξιού (SFd) οδηγεί σε ενίσχυση της ανθεκτικότητας με αποτέλεσμα μεγάλη δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης των μεταξωτών υφασμάτων.

Πίνακας 3-2. Αντιοξειδωτική δραστηριότητα των υλικών του μεταξιού μέσω HAT και η δυνατότητα επαναχρησιμοποίησής τους.

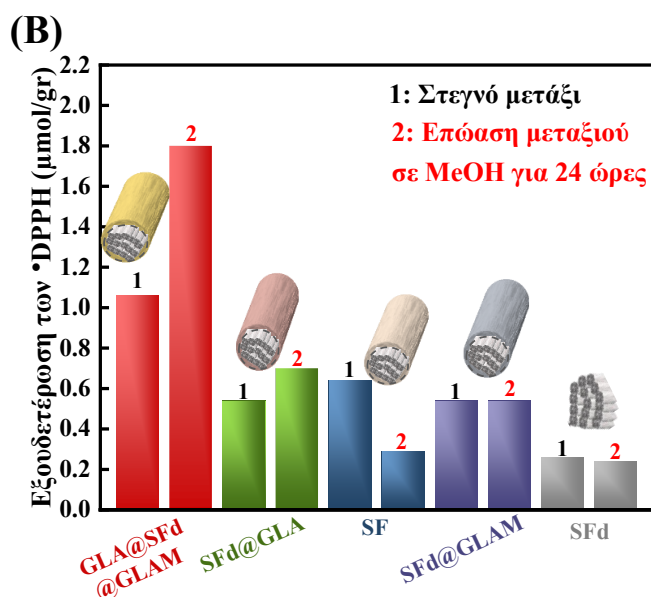
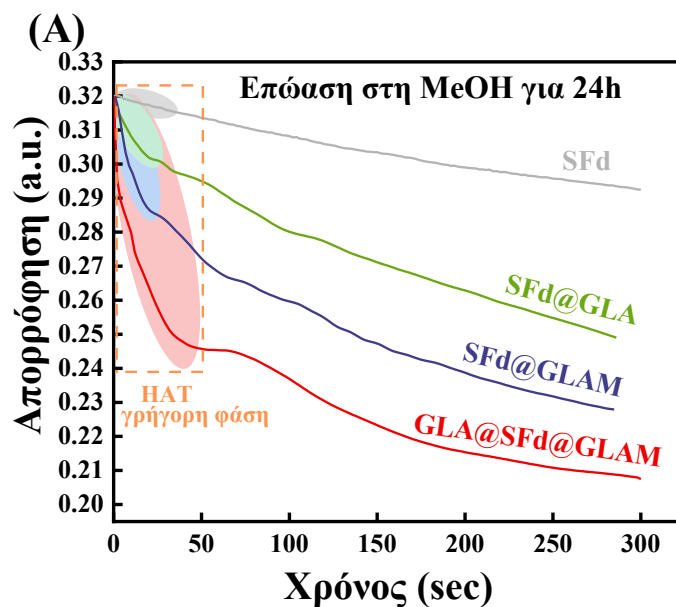
<i>Υλικό</i>	<i>Αντιοξειδωτική ικανότητα HAT [μmoles του DPPH ανά γραμμάριο υλικού] (± 0.1)</i>	<i>n_{fast} [μmoles του DPPH ανά μmoles των εμβολιασμένων GLA, GLAM] ($\pm 0.05 \times 10^{-2}$)</i>	<i>Επαναχρήσεις</i>
<i>SF</i>	0.64		4
<i>SFd</i>	0.26		2
<i>SFd@GLA</i>	0.54	0.19×10^{-2}	10
<i>SFd@GLAM</i>	0.54	0.19×10^{-2}	10
<i>GLA@SFd@GLAM</i>	1.06	Για GLA: 0.37×10^{-2} Για GLAM: 0.96×10^{-2}	10

3.2.2.1. Επίδραση της επώασης των ινών σε MeOH πριν από τη χρήση

Η αντιοξειδωτική ικανότητα όλων των υφασμάτων αναλύθηκε μετά από 24ωρη επώασή τους σε μεθανόλη πριν από τη χρήση και οι αντίστοιχες κινητικές δίνονται στην **Εικόνα 3-27**. Με βάση αυτό, είναι προφανές ότι μετά από επώαση σε MeOH για 24 ώρες, υπάρχουν κάποιες αλλαγές (**Εικόνα 3-27**). Συγκεκριμένα, τα στεγνά δείγματα των υβριδικών υλικών SFd@GLA, SFd@GLAM και GLA@SFd@GLAM μπορούν να εξουδετερώσουν 0.54, 0.54 και 1.06 μmol ριζών DPPH ανά γραμμάριο κάθε υλικού, ενώ, μετά την επώασή τους σε MeOH, οι τιμές αυτές βρέθηκαν να είναι 0.7, 0.54 και 1.8 μmol DPPH ανά γραμμάριο υφάσματος, αντίστοιχα. Ειδικότερα, παρατηρείται αύξηση της αντιοξειδωτικής δράσης των υβριδικών υλικών SFd@GLA και GLA@SFd@GLAM. Συμπερασματικά, τα δύο υβριδικά υλικά SFd@GLA και GLA@SFd@GLAM επιδεικνύουν αύξηση της αντιοξειδωτικής τους δράσης μετά από επώασή τους σε διάλυμα μεθανόλης, ενώ η αντιοξειδωτική δράση του υβριδικού υλικού SFd@GLAM, καθώς και του SFd, παραμένει αμετάβλητη. Η αντιοξειδωτική δράση του φυσικού μεταξιού μειώνεται μετά από επώαση σε μεθανόλη.

Συμπερασματικά από την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης των υβριδικών υλικών SFd@GLA, SFd@GLAM και του διπλά εμβολιασμένου GLA@SFd@GLAM, το καλύτερο υβριδικό υλικό είναι το διπλά εμβολιασμένο GLA@SFd@GLAM το οποίο συνολικά λαμβάνοντας υπόψη και τις επαναχρησιμοποιήσεις μπορεί να εξουδετερώσει μέχρι και 11 μmol ριζών DPPH/gr υλικού GLA@SFd@GLAM.

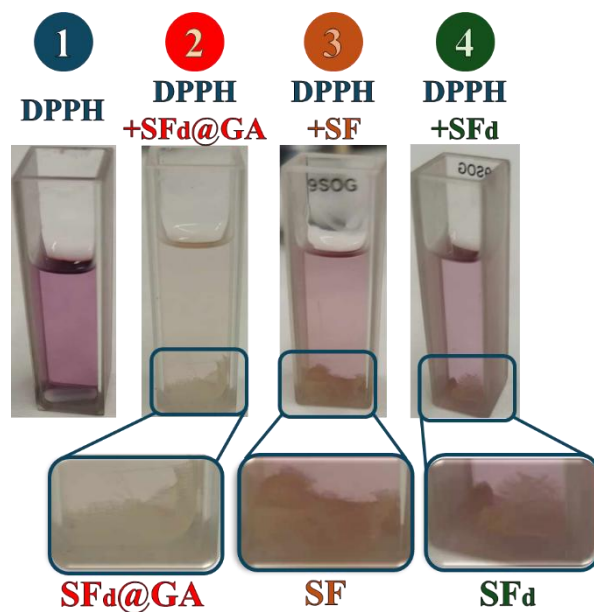
Γνωρίζοντας ότι το υβριδικό υλικό SiO₂@GA με υλικό υποστήριξης σίλικα εμφανίζει πολύ πιο ισχυρή αντιοξειδωτική δράση από τα υβριδικά υλικά SiO₂@GLA, SiO₂@GLAM και GLA@SiO₂@GLAM με μήτρα SiO₂ επίσης, προχωρήσαμε στη μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας του υβριδικού υλικού SFd@GA, που παρουσιάζεται ευθύς αμέσως.



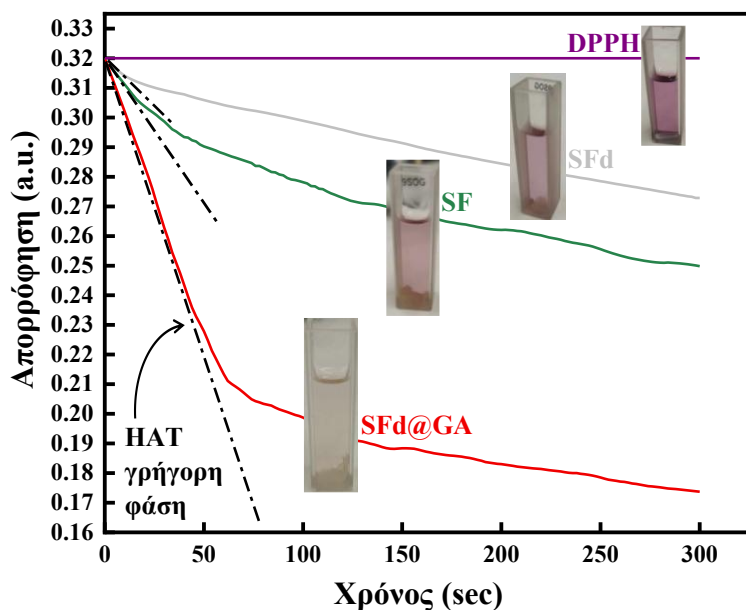
Εικόνα 3-27. (Α) Κινητική της αντιοξειδωτικής (HAT) δράσης για SFd, SFd@GLA, SFd@GLAM και του διπλά εμβολιασμένου GLA@SFd@GLAM μετά από επώαση σε διάλυμα μεθανόλης με τη μέθοδο DPPH. (Β) Ποσοτικοποίηση με μπαρογράμματα της εξουδετέρωσης των ριζών DPPH ανά γραμμάριο υλικού σε διαφορετικές συνθήκες: (1) στεγνά υφάσματα (2) μετά από επώασή τους σε MeOH για 24 ώρες.

3.2.3. Αξιολόγηση της ικανότητας εξουδετέρωσης ριζών DPPH από το υβριδικό υλικό SFd@GA

Και εδώ η αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης του SFd@GA πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο DPPH. Αυτή περιλάμβανε όμοια την παρακολούθηση της χρονικής εξέλιξης του φάσματος της ρίζας DPPH σε διάλυμα μεθανόλης κατά τη διάρκεια της αλληλεπίδρασής της με το αντιοξειδωτικό ^{87,132,237}, καθώς αυτή εμφανίζει ένα έντονο βιολετί χρώμα, το οποίο αποχρωματίζεται ανάλογα με την ισχυρότητα του αντιοξειδωτικού (**Εικόνα 3-28**). Για τη μελέτη, ένα τμήμα περιτυλιγμένου μεταξιού τοποθετείται στη βάση της κυψελίδας, ενώ το μεθανολικό διάλυμα DPPH εισάγεται επιτόπου στο θάλαμο του φασματοφωτομέτρου UV-Vis. Στη συνέχεια, παρακολουθείται συνεχώς η χρονική εξέλιξη της απορρόφησης DPPH στα 515 nm και η οποία δίνεται στην **Εικόνα 3-29**.



Εικόνα 3-28. Όσο μειώνεται η ιώδης απόχρωση της ρίζας του DPPH, τόσο αποικοδομείται η ρίζα αυτή. Οι εικόνες σε μεγέθυνση απεικονίζουν τα αυθεντικά υφάσματα με βάση το μετάξι τα οποία βρίσκονται τοποθετημένα στη βάση της κυψελίδας. Οι εικόνες, οι οποίες καταγράφηκαν σε $t=60$ sec μετά την αλληλεπίδραση, απεικονίζουν έντονα την ταχεία απόσβεση της ρίζας DPPH από το SFd@GA, ενώ η εξουδετέρωση των ριζών DPPH από το αποκομμιωμένο μετάξι και το ακατέργαστο μετάξι είναι πολύ πιο μικρή.



Εικόνα 3-29. Η κινητική της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω της μεταφοράς ατόμων υδρογόνου (HAT) του ακατέργαστου μεταξιού (SF), του υλικού SFd και SFd@GA αξιολογήθηκε με τη μέθοδο DPPH. Η εφαπτομένη στην έναρξη της αποδόμησης οριοθετεί την έναρξη της φάσης HAT.

Σύμφωνα με τα δεδομένα που απεικονίζονται στην **Εικόνα 3-29**, το SFd@GA παρουσιάζει μια σημαντικά επιταχυνόμενη εξουδετέρωση της ρίζας DPPH, ενδεικτική της αυξημένης αντιοξειδωτικής του δράσης. Αυτό υποδηλώνει ότι το SFd@GA παρουσιάζει πολύ μεγαλύτερη αντιοξειδωτική αποτελεσματικότητα σε σύγκριση με τα SF και SFd. Ως εκ τούτου, η παρατηρούμενη σειρά αντιοξειδωτικής δράσης είναι $\text{SFd@GA} > \text{SF} > \text{SFd}$. Τα αποτελέσματα αυτά ευθυγραμμίζονται με την κατανόηση ότι (i) το μη επεξεργασμένο μετάξι (SF), το οποίο διατηρεί τη σερικίνη, μια επιφανειακή πρωτεΐνη γνωστή για τις εγγενείς αντιοξειδωτικές της ιδιότητες, εμφανίζει ένα διακριτό, αν και μέτριο επίπεδο αντιοξειδωτικής δραστηριότητας, ενώ το αποκομμιωμένο μετάξι, SFd, χωρίς σερικίνη, εμφανίζει ελάχιστη ικανότητα Μεταφοράς Ατόμων Υδρογόνου (HAT) και μικρότερη από αυτή του ακατέργαστου μεταξιού. (ii) Το SFd@GA ενσωματώνει μέσω ομοιοπολικής σύνδεσης το γαλλικό οξύ (GA), γνωστό για τις ισχυρές αντιοξειδωτικές του ιδιότητες. Ως εκ τούτου, μέσω του εμβολιασμού του γαλλικού οξέος στην επιφάνεια του αποκομμιωμένου SFd, ενισχύουμε επιτυχώς την αντιοξειδωτική ισχύ του SFd σε βαθμό που ξεπερνά αυτόν του φυσικού μεταξιού, SF. Η παρατηρούμενη αντιοξειδωτική δράση σε αυτό το πλαίσιο αποδίδεται στον μηχανισμό Μεταφοράς Ατόμων Υδρογόνου (HAT), έναν

μηχανισμό που χρησιμοποιούν συνήθως οι φαινολικές ενώσεις και οι πολυφαινόλες ⁵. Ο μηχανισμός HAT (Μεταφορά Ατόμου Υδρογόνου) χαρακτηρίζεται από την ταυτόχρονη μεταφορά ενός πρωτονίου και ενός ηλεκτρονίου, που αποτελούν ένα άτομο υδρογόνου ⁷⁹. Στο πλαίσιο του μηχανισμού HAT, η μεταφορά τόσο του πρωτονίου όσο και του ηλεκτρονίου πραγματοποιείται μεταξύ του ίδιου δότη και δέκτη ⁸⁴.

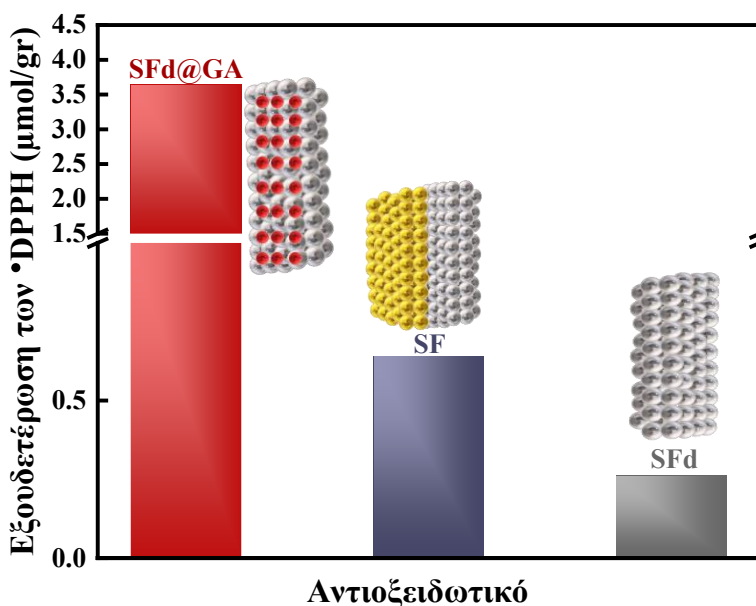
Στη συνέχεια, χρησιμοποιώντας την εξίσωση Lambert-Beer (**Εξίσωση 3-1**) ²⁷¹, που αναφέρθηκε προηγουμένως ποσοτικοποιήθηκε η έκταση της απορρόφησης των ριζών DPPH που εξουδετερώνονται από κάθε υλικό μέσω του μηχανισμού HAT. Έτσι, εκτιμήθηκε η ποσότητα των ριζών DPPH που εξουδετερώθηκαν ανά γραμμάριο κάθε υλικού στην ταχεία φάση της **Εικόνα 3-29**. Τα δεδομένα αυτά παρουσιάζονται στην **Εικόνα 3-30** και αποκαλύπτουν ότι 1 γραμμάριο μεταξιού (SF) ή αποκομμωμένου μεταξιού (SFd) μπορεί να εξουδετερώσει αποτελεσματικά 0.64 μmol ή 0.26 μmol ριζών DPPH, αντίστοιχα, υπογραμμίζοντας τη μη αμελητέα ικανότητα Μεταφοράς Ατόμων Υδρογόνου (HAT) του άθικτου μεταξιού. Επιπλέον, αποκαλύπτουν ότι 1 γραμμάριο SFd@GA παρουσιάζει ικανότητα εξουδετέρωσης 3.64 μmol ριζών DPPH, σηματοδοτώντας ότι με τον εμβολιασμό γαλλικού οξέος (GA) στην επιφάνεια του αποκομμωμένου μεταξιού SFd, επιτυγχάνουμε αξιοσημείωτη ενίσχυση της αντιοξειδωτικής-HAT δραστηριότητας του SFd@GA, με αύξηση 550% σε σύγκριση με το φυσικό άθικτο μετάξι και περίπου 1400% αύξηση σε σύγκριση με το αποκομμωμένο μετάξι.

Ποσοτική εκτίμηση της στοιχειομετρίας:

$$(n_{\text{fast}}) = [\text{ρίζες-DPPH που εξουδετερώνονται/ανά εμβολιασμένο μόριο γαλλικού οξέος}]$$

Βάσει της ποσοτικής εκτίμησης της στοιχειομετρίας, αποδεικνύεται ότι το υβριδικό υλικό SFd@GA έχει τιμή $n_{\text{fast}} = 0.85 \times 10^{-2}$. Μια συνολική ανάλυση, που περιλαμβάνει τις **Αντιδράσεις 3-1, 3-2, 3-3** καθώς και δεδομένα από προηγούμενη μελέτη ¹⁰⁶, δείχνει ότι η τιμή του n_{fast} μπορεί να φτάσει το 2.0. Αυτό σημαίνει ότι οι δύο γειτονικές υδροξυλομάδες (-OH) του γαλλικού οξέος (GA) μπορούν να εξουδετερώσουν αποτελεσματικά μία ρίζα DPPH η καθεμία. Ως αποτέλεσμα, κάθε ομάδα -OH μετατρέπεται σε ένα τμήμα $[-\text{O}^\bullet]$ ή δύο $[-\text{O}^\bullet]$, οδηγώντας στον σχηματισμό μιας κατάστασης με δύο καρβονυλομάδες ($\text{C}=\text{O}$), γνωστής και ως κινόνη. Η εκτιμώμενη τιμή $n_{\text{fast}} = 0.85 \times 10^{-2}$ υποδηλώνει ότι μόνο ένα μέρος των μορίων του εμβολιασμένου γαλλικού οξέος (GA) δρα ως παράγοντας Μεταφοράς Ατόμων Υδρογόνου (HAT) στο SFd@GA κατά τη διάρκεια κάθε

χρήσης. Ωστόσο, όπως καταδεικνύεται στη συνέχεια, η επαναλαμβανόμενη χρήση του ίδιου υφάσματος SFd@GA αποκαλύπτει ότι ομάδες εμβολιασμένων μορίων γαλλικού οξέος μπορούν να ενεργοποιηθούν σε HAT μετά από διαδοχικές επαναχρησιμοποιήσεις.

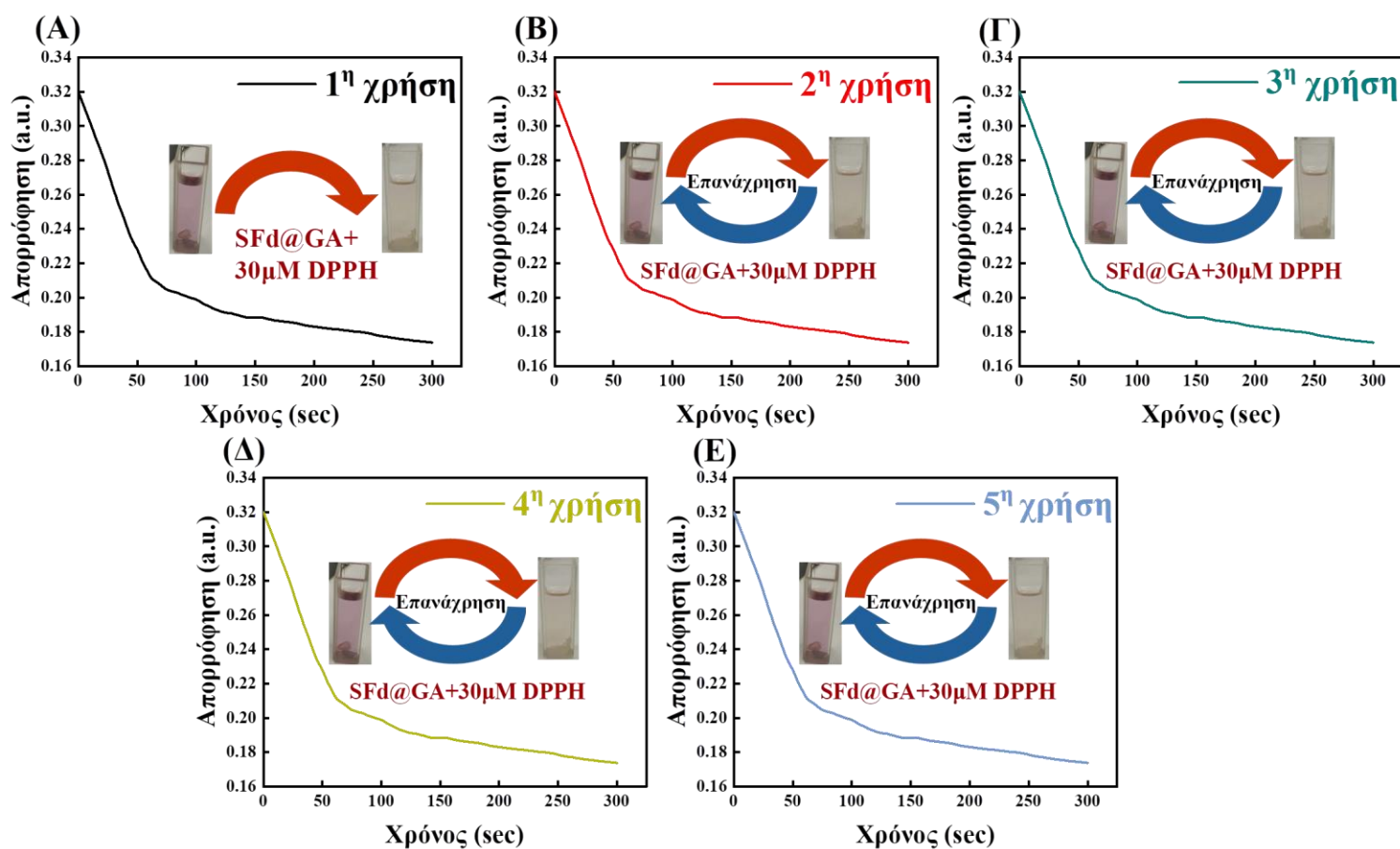


Εικόνα 3-30. Ποσοτικοποίηση της εξουδετέρωσης ριζών DPPH ανά γραμμάριο SFd@GA, SFd και ακατέργαστου μεταξωτού υφάσματος (SF).

3.2.4. Δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης του υβριδικού υλικού SFd@GA

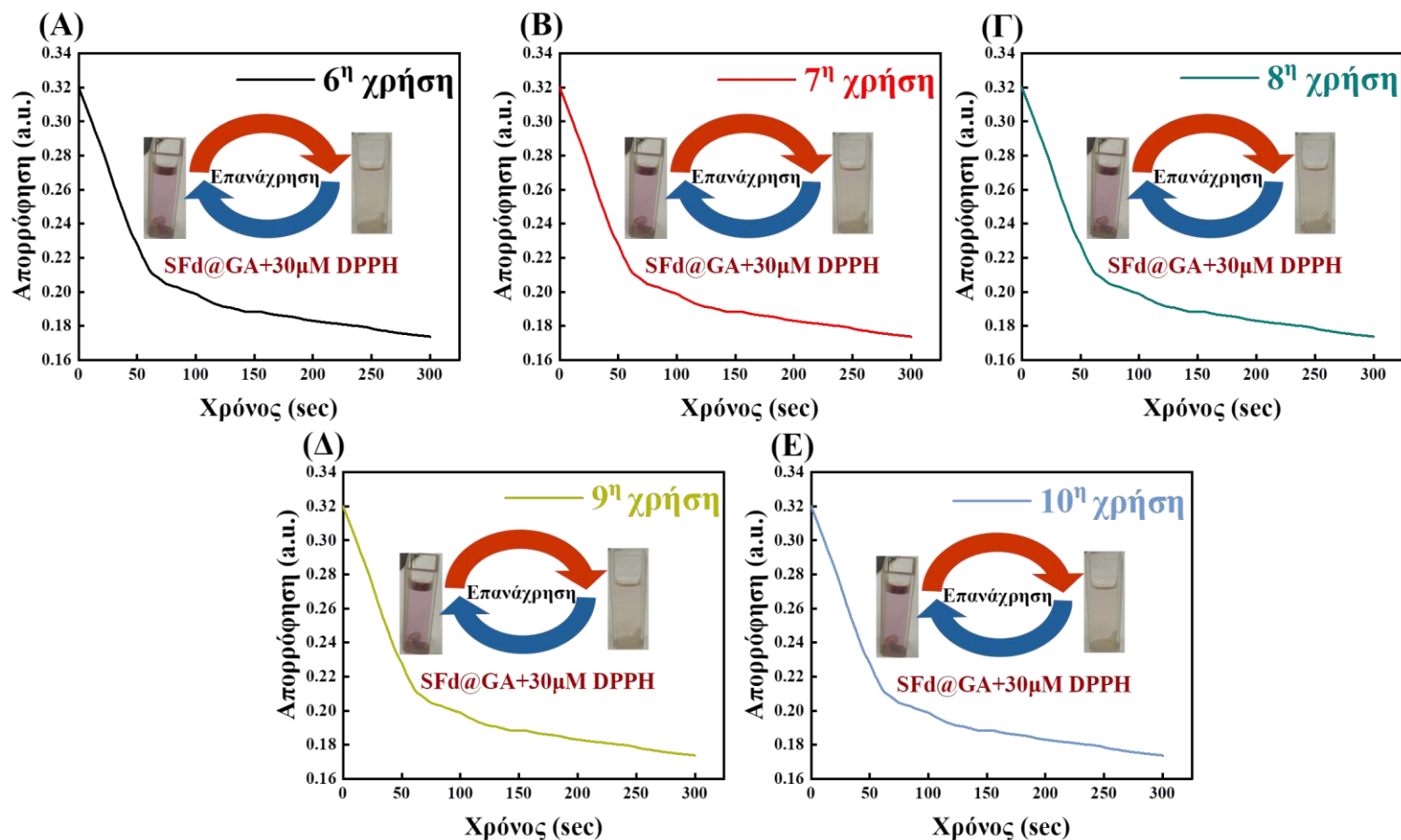
Μετά την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης, στην οποία αποδεικνύεται ότι το υβριδικό υλικό SFd@GA παρουσίασε σημαντικά υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα φτάνοντας στην εξουδετέρωση 3.6 μmol ριζών DPPH/gr υλικού, σε σύγκριση με το SFd και το SF που εξουδετερώνουν 0.26 και 0.64 μmol ριζών DPPH/gr υλικού αντίστοιχα διερευνήθηκε η

δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης του υλικού SFd@GA. Κατά συνέπεια, μετά την αρχική του χρήση ανασύρθηκε από την κυψελίδα και υποβλήθηκε σε περίοδο ξήρανσης 2 λεπτών σε ατμοσφαιρικό αέρα. Κατόπιν αυτού, η αντιοξειδωτική-HAT δραστηριότητα του SFd@GA αξιολογήθηκε εκ νέου με τη μέθοδο DPPH. Η αντιοξειδωτική αποτελεσματικότητα του υλικού SFd@GA παρέμεινε σταθερή σε διάφορους κύκλους, όπως απεικονίζεται στην **Εικόνα 3-31** A-E. Σε ότι αφορά τα SF και SFd η ικανότητα επαναχρησιμοποίησης τους έχει αναλυθεί στην Ενότητα 3.2.2.



Εικόνα 3-31. Οι διαδοχικές επαναχρησιμοποιήσεις του υλικού SFd@GA έδειξαν σταθερή εξουδετέρωση των ριζών DPPH. Τα φάσματα (A) έως (E) απεικονίζουν τον πρώτο έως τον πέμπτο κύκλο επαναχρησιμοποίησης. Καθ' όλη τη διάρκεια αυτών των μετρήσεων, χρησιμοποιήθηκε το ίδιο ύφασμα SFd@GA αφού υποβλήθηκε σε περίοδο ξήρανσης 2 λεπτών σε συνθήκες ατμοσφαιρικού αέρα.

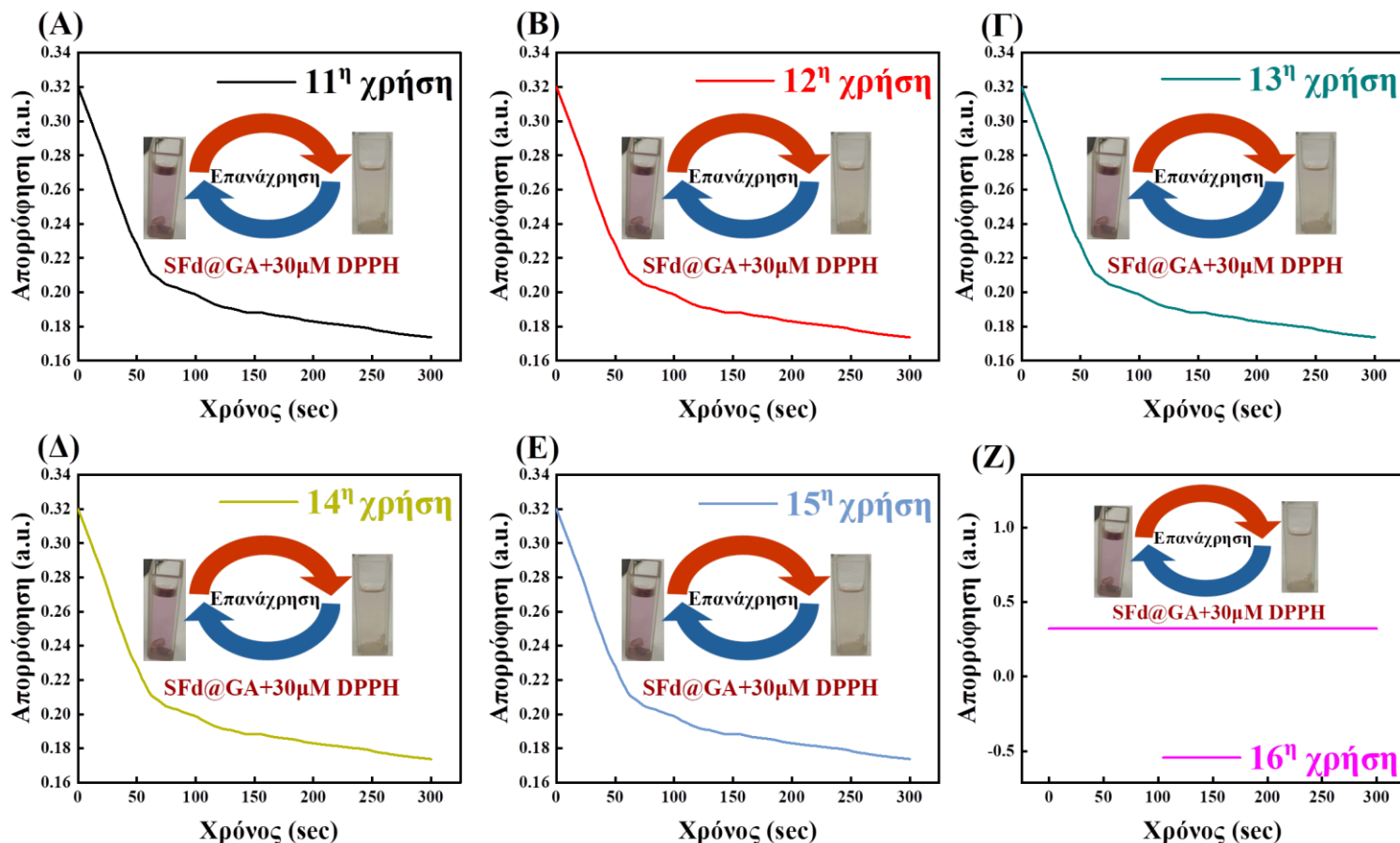
Στη συνέχεια, το χρησιμοποιημένο ύφασμα SFd@GA εκτέθηκε στον ατμοσφαιρικό αέρα για 24 ώρες, και έπειτα αξιολογήθηκε εκ νέου η αντιοξειδωτική του δράση. Όπως απεικονίζεται στην **Εικόνα 3-32**, η αντιοξειδωτική ικανότητα του υλικού παρέμεινε εντελώς αμετάβλητη, χωρίς να παρουσιάζει διακριτές μεταβολές.



Εικόνα 3-32. Η αντιοξειδωτική δράση του υλικού SFd@GA αξιολογήθηκε με τη μέθοδο DPPH μετά από 24 ώρες έκθεσης στον ατμοσφαιρικό αέρα και διαδοχικές επαναχρησιμοποιήσεις. Τα φάσματα (Α) έως (Ε) απεικονίζουν τον έκτο έως τον δέκατο κύκλο επαναχρησιμοποίησης. Για τις αξιολογήσεις αυτές, χρησιμοποιήθηκε το ίδιο ύφασμα SFd@GA μετά από 24 ώρες έκθεσης στον ατμοσφαιρικό αέρα.

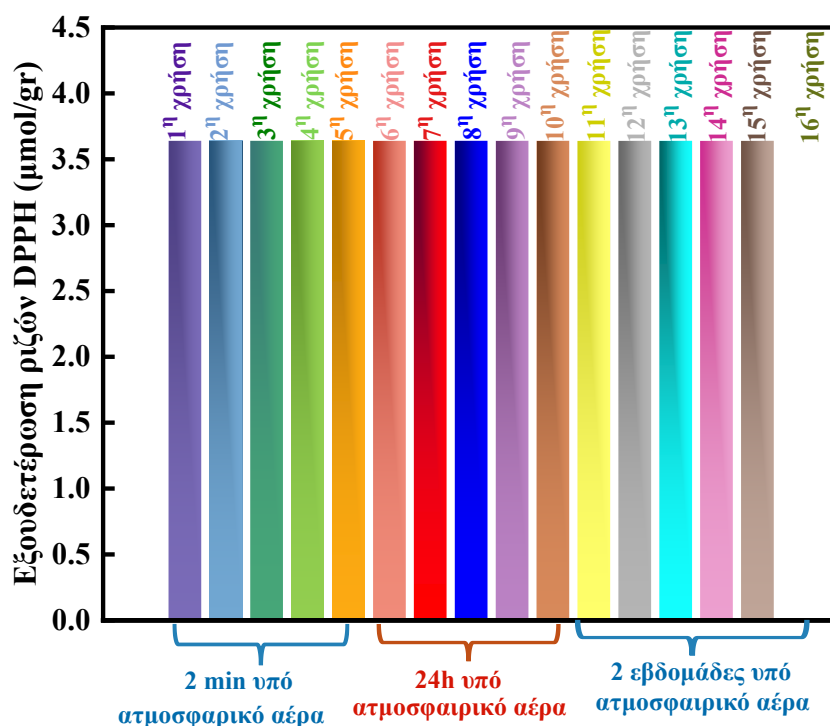
Τέλος, το ύφασμα SFd@GA υποβλήθηκε σε έκθεση στον ατμοσφαιρικό αέρα για μία εβδομάδα. Είναι αξιοσημείωτο ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα του υλικού SFd@GA παρέμεινε εντελώς αμετάβλητη ακόμη και μετά από μία εβδομάδα και 11 διαδοχικές χρήσεις, όπως

απεικονίζεται στην **Εικόνα 3-33**. Η συμπεριφορά αυτή διατηρήθηκε για τέσσερις επιπλέον κύκλους επαναχρησιμοποίησης, όπως υποδεικνύεται στην **Εικόνα 3-33**. Τα δεδομένα αυτά καταδεικνύουν ότι το ύφασμα SFd@GA μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί για έως και 15 κύκλους με παρατεταμένη διάρκεια χωρίς αξιοσημείωτη αλλαγή στην αντιοξειδωτική του δράση μέσω Μεταφοράς Ατόμου Υδρογόνου (HAT). Η αντιοξειδωτική δράση του υλικού αναστέλλεται και εξαντλείται μόνο μετά τη 16^η χρήση, όπως απεικονίζεται στην **Εικόνα 3-33**.



Εικόνα 3-33. Η αντιοξειδωτική δράση του υλικού SFd@GA αξιολογήθηκε με τη μέθοδο DPPH μετά από 1 εβδομάδα έκθεσης στον ατμοσφαιρικό αέρα και διαδοχικές επαναχρησιμοποιήσεις. Τα φάσματα (Α) έως (Ζ) αντιπροσωπεύουν τον 11^ο έως 16^ο κύκλο επαναχρησιμοποίησης, αντίστοιχα. Για τις αξιολογήσεις αυτές, χρησιμοποιήθηκε το ίδιο ακριβώς ύφασμα SFd@GA μετά από μία εβδομάδα έκθεσης στον ατμοσφαιρικό αέρα.

Με βάση τα προαναφερθέντα αποτελέσματα, είναι σαφές ότι το υβριδικό υλικό SFd@GA επιδεικνύει πολύ υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση σε σύγκριση με το SFd και το SF. Ωστόσο, το πιο αξιοσημείωτο χαρακτηριστικό αυτού του υλικού είναι η ικανότητά του για επαναχρησιμοποίηση, διατηρώντας την αποτελεσματικότητά του για έως και 15 χρήσεις σε διάστημα μίας εβδομάδας χωρίς να παρουσιάσει μείωση της αντιοξειδωτικής του δράσης (**Εικόνα 3-34**), έναντι των δύο με τεσσάρων κύκλων επαναχρησιμοποίησης των SF, SFd. Τα αθροιστικά δεδομένα Μεταφοράς Ατόμων Υδρογόνου (HAT), που αντιπροσωπεύουν τις διαδοχικές επαναχρησιμοποιήσεις, υποδηλώνουν ότι 1 γραμμάριο SFd@GA μπορεί να απομακρύνει αποτελεσματικά συνολικά περίπου 55 μmol ριζών DPPH, χρησιμοποιώντας έτσι περίπου το 14% του εμβολιασμένου γαλλικού οξέος (GA).



Εικόνα 3-34. Δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης του SFd@GA σε διαφορετικές συνθήκες. Μετά από κάθε χρήση, το SFd@GA υποβαλλόταν σε ολιγόλεπτη ξήρανση στον ατμοσφαιρικό αέρα.

Συγκριτικά και με τα προηγούμενα υβριδικά υλικά SFd@GLA, SFd@GLAM και το διπλά εμβολιασμένο GLA@SFd@GLAM, το SFd@GA φαίνεται να είναι το πιο αποτελεσματικό. Εκτός από το γεγονός ότι διαθέτει από την αρχή την υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση σε σύγκριση με

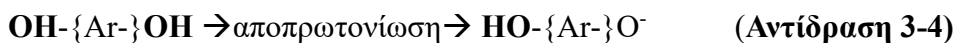
τα υπόλοιπα υβριδικά υλικά του αποκομιωμένου μεταξιού, παρουσιάζει και εξαιρετική σταθερότητα, καθώς μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί έως και 15 φορές χωρίς καμία μείωση της αντιοξειδωτικής του δράσης. Αντίθετα, τα υπόλοιπα υβριδικά υλικά (SFd@GLA, SFd@GLAM και GLA@SFd@GLAM) μπορούν να επαναχρησιμοποιηθούν μόνο έως 10 φορές. Η κατάταξη των υβριδικών υλικών με βάση τη μήτρα του αποκομιωμένου μεταξιού (SFd) και τη δυνατότητα επαναχρησιμοποίησής τους διαμορφώνεται ως εξής:



Για την απόκτηση μιας βαθύτερης κατανόησης αυτού του ενδιαφέροντος φαινομένου, πραγματοποιήθηκε μια πιο εξειδικευμένη μελέτη που επικεντρώνεται στις ιδιότητες των OH-ομάδων του GA σε σχέση με τον διαλύτη και τη διεπιφάνεια του μεταξιού.

3.2.5. Διερεύνηση του μηχανισμού επανενεργοποίησης της αντιοξειδωτικής αποτελεσματικότητας στο SFd@GA

Για να κατανοηθεί ο μηχανισμός επαναχρησιμοποίησης του υβριδικού υλικού SFd@GA, πραγματοποιήθηκε μελέτη του υλικού SFd@GA με τη χρήση EPR. Ο στόχος ήταν η επικύρωση της ικανότητας μορίων γαλλικού οξέος που υπάρχουν στο υβριδικό υλικό SFd@GA να επανενεργοποιούν τις φαινολικές τους ρίζες, παρέχοντας έτσι μια δεξαμενή προσβάσιμων ομάδων OH με ικανότητα Μεταφοράς Ατόμων Υδρογόνου (HAT). Αυτή η ακολουθία διευκρινίζεται στις αντιδράσεις σχηματισμού ριζών (Αντιδράσεις 3-4, 3-5) υπό O₂, όπου το [OH-{Ar}-OH] αντιπροσωπεύει τη φαινολική ομάδα του γαλλικού οξέος ¹⁰⁶.



Για να συνδέσουμε την διαδικασία Μεταφοράς Ατόμων Υδρογόνου (HAT) με τη διαδικασία σχηματισμού ριζών γαλλικού οξέος, επισημαίνονται με έντονη γραφή οι καταστάσεις

OH στην (1α) που είναι αποκλειστικά ικανές να διεξάγουν HAT έναντι των ριζών DPPH. Στις (**Αντιδράσεις 3-1, 3-2, 3-3**) οι οποίες αναφέρθηκαν και πιο πάνω, τα μεταφερόμενα άτομα υδρογόνου προσδιορίζονται με έντονα και υπογραμμισμένα "**H**". Οι αντιδράσεις 3-1 και 3-2 διευκρινίζουν το θεωρητικό όριο $n_{fast}=2$ του γαλλικού οξέος.

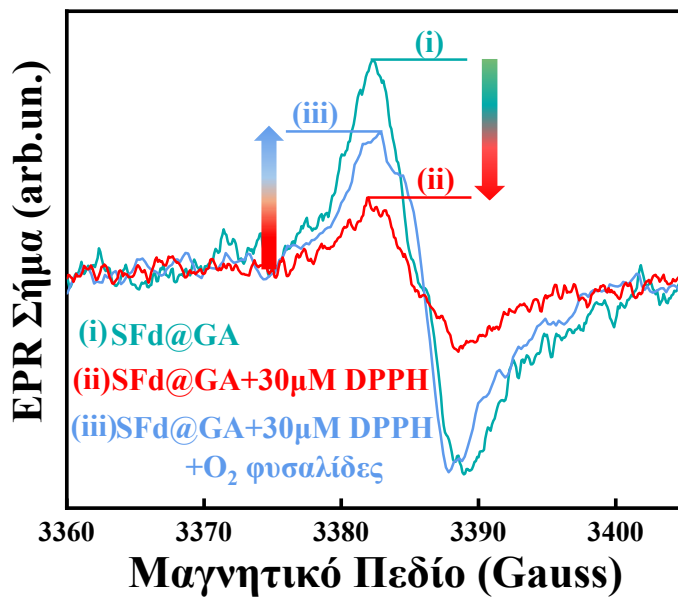


Στην **Εικόνα 3-35** (i), απεικονίζεται το χαρακτηριστικό φάσμα EPR της ρίζας του γαλλικού οξέος που παρατηρήθηκε στο υλικό SFd@GA που δεν είχε υποστεί καμία περαιτέρω επεξεργασία.

Το φάσμα αυτό αντιστοιχεί στην τυπική κατάσταση GA-ρίζα $=HO-\{Ar-\}O^{\bullet}$ που σχηματίζεται όταν το SFd@GA εκτίθεται σε περιβάλλον O_2 . Κατά την αλληλεπίδραση με DPPH, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 3-35** (ii), η ένταση του σήματος της ρίζας γαλλικού οξέος μειώνεται, ευθυγραμμιζόμενη με την **Αντίδραση 3-3**. Το φαινόμενο αυτό αποδεικνύει τον καθιερωμένο μηχανισμό Μεταφοράς Ατόμων Υδρογόνου (HAT), όπου το γαλλικό οξύ εξουδετερώνει τις ρίζες DPPH και μετατρέπεται σε μια μη ριζική κατάσταση κινόνης, όπως απεικονίζεται στην **Αντίδραση 3-3**⁸⁷. Μετά την κατεργασία του δείγματος [SFd@GA/DPPH-MeOH] με φυσαλίδες O_2 για 30 λεπτά, το σήμα EPR που αντιστοιχεί στις ρίζες του γαλλικού οξέος αποκαταστάθηκε [**Εικόνα 3-35** (iii)]. Η αποκατάσταση αυτή αποδίδεται στην **Αντίδραση 3-2**, που αντιπροσωπεύει

το σχηματισμό της κατάστασης $HO-\{Ar-\}O^{\bullet}$. Δεδομένης της μη αντιστρεψιμότητας της

Αντίδραση 3-3, η ανίχνευση του βήματος **3-2** υποδηλώνει οξείδωση *νεοεισαγόμενων άθικτων φαινολικών ομάδων* OH από τα εμβολιασμένα μόρια γαλλικού οξέος κατά τη διάρκεια του βήματος της έκθεσής τους σε O_2 .

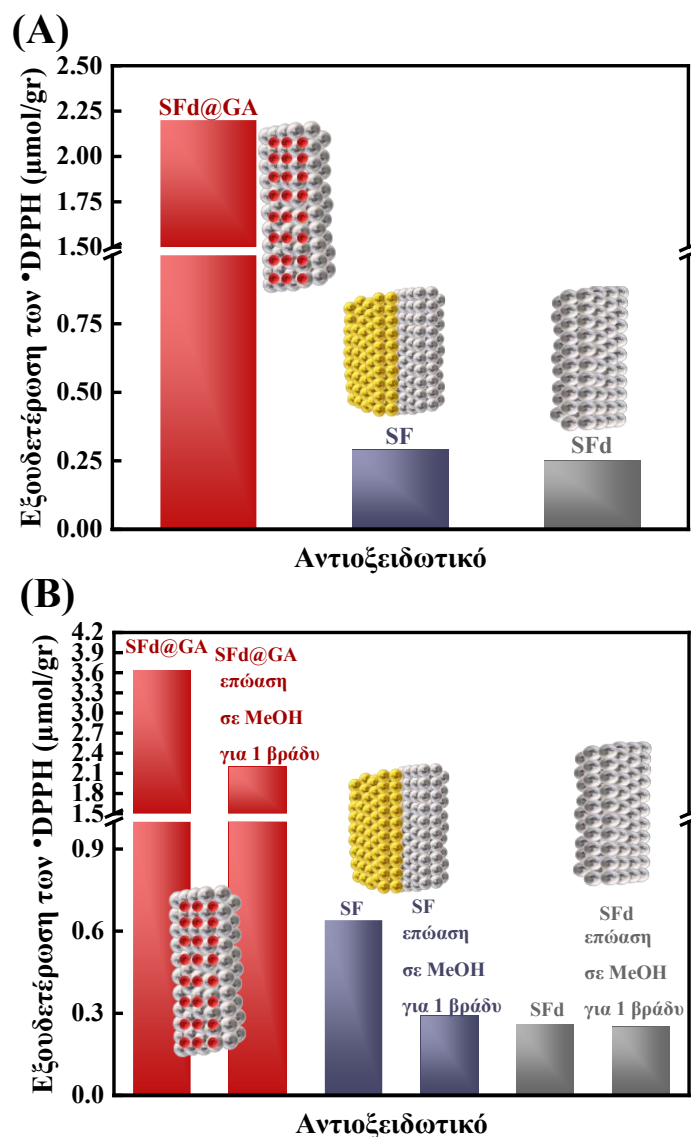


Εικόνα 3-35. Παρακολούθηση μέσω EPR της αναγέννησης της ικανότητας σχηματισμού ριζών γαλλικού οξέος για το υλικό SFd@GA: (i) SFd@GA (πράσινη γραμμή), (ii) SFd@GA + 30 μ M διάλυμα DPPH (κόκκινη γραμμή), (iii) όπως στο (ii) + φυσαλίδες O_2 για 30 λεπτά (μπλε γραμμή).

Επομένως, τα δεδομένα EPR υποδηλώνουν ότι όταν το SFd@GA εκτίθεται σε O_2 , οδηγεί στη δημιουργία πρόσθετων ριζών γαλλικού οξέος, γεγονός που υποδηλώνει την παρουσία μιας δεξαμενής ενεργών ομάδων OH που προέρχονται από το εμβολιασμένο γαλλικό οξύ στο μετάξι. Κατά συνέπεια, μόνο ένα κλάσμα του εμβολιασμένου γαλλικού οξέος χρησιμοποιείται σε κάθε διεργασία HAT, σύμφωνα με το παρατηρούμενο $n_{fast} \ll 2$, με $n_{fast}=2$ το θεωρητικό ανώτατο όριο.

Για περαιτέρω εμβάθυνση στην κατανόηση της υποκείμενης δυνατότητας επαναχρησιμοποίησης του SFd@GA, διεξήχθη ένα πρόσθετο πείραμα όπου τα υλικά SF, SFd και SFd@GA επαναχρησιμοποιήθηκαν χωρίς να υποστούν ξήρανση σε συνθήκες ατμοσφαιρικού αέρα. Για την εκτέλεση του πειράματος, τα υλικά επωάστηκαν κατά τη διάρκεια μιας νύχτας σε διάλυμα μεθανόλης, σε αντίθεση με τις συνθήκες που απεικονίζονται στην **Εικόνα 3-36**, όπου η ξήρανση στον ατμοσφαιρικό αέρα χρησιμοποιήθηκε για πολλαπλά 24ωρα. Τα δεδομένα, τα οποία παρουσιάζονται στην **Εικόνα 3-36**, αποκαλύπτουν σαφώς ότι τα υλικά που παρέμειναν σε μεθανόλη (MeOH) για 24 ώρες παρουσιάζουν μειωμένη αντιοξειδωτική-HAT δραστηριότητα, με τις τιμές να μειώνονται από 3.64 σε 2.2 μ mol DPPH ανά γραμμάριο SFd@GA, σε σύγκριση με τα αντίστοιχα υλικά που εκτέθηκαν σε ξήρανση στον αέρα, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 3-36**.

Δηλαδή, όπως απεικονίζεται στην **Εικόνα 3-35**, η ξήρανση στον αέρα διευκολύνει την πλήρη αποκατάσταση της Μεταφοράς Ατόμων Υδρογόνου (HAT). Αυτή η μάλλον απροσδόκητη αποκάλυψη υπογραμμίζει τη σημασία της ξήρανσης στο υλικό SFd@GA, η οποία συνεργάζεται αρμονικά με μια ανθεκτική αντιοξειδωτική αποτελεσματικότητα.



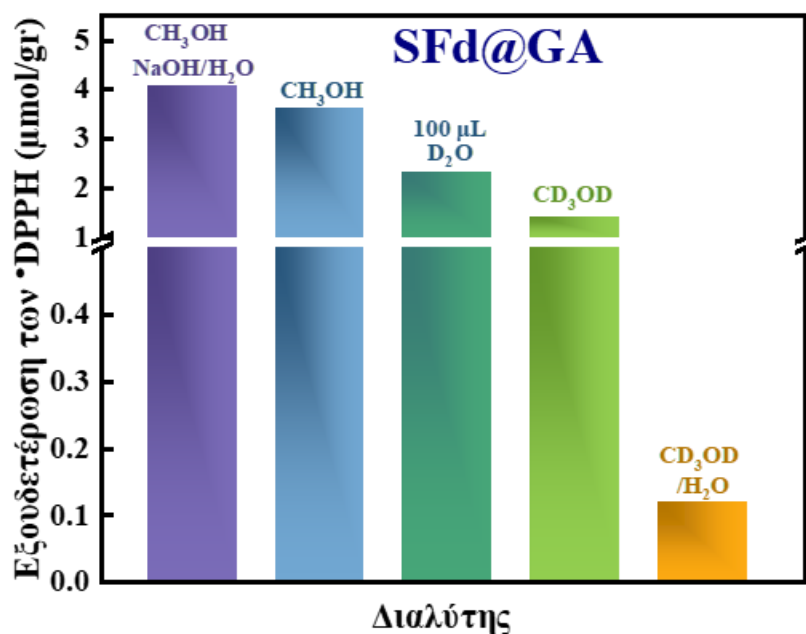
Εικόνα 3-36. Ραβδογράμματα που ποσοτικοποιούν την εξουδετέρωση ριζών DPPH ανά γραμμάριο υλικού υπό τις ακόλουθες συνθήκες: (A) μετά από επώαση σε μεθανόλη (MeOH) και (B) συγκριτική αξιολόγηση της εξουδετέρωσης ριζών DPPH ανά γραμμάριο υλικού επωασμένου σε MeOH σε σχέση με ένα ξηρό δείγμα.

3.2.6. Η αντιοξειδωτική δραστηριότητα του SFd@GA σε διάφορα μέσα

Για να παραχθούν πρόσθετες πληροφορίες σχετικά με τις πιθανές αλληλεπιδράσεις μεταξύ SFd και γαλλικού οξέος και την επίδραση της μεταξωτής μήτρας του SFd, διερευνήθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα Μεταφοράς Ατόμων Υδρογόνου (HAT) του SFd@GA σε διάφορους διαλύτες. Η υποκείμενη υπόθεση ήταν ότι τοπικά διεπιφανειακά φαινόμενα, όπως δεσμοί υδρογόνου, τοπικά φορτία, υδρόφοβες/υδρόφιλες ιδιότητες, μεταξύ άλλων, θα μπορούσαν να διαμορφώσουν την παρατηρούμενη δραστηριότητα HAT και την ανθεκτικότητα του SFd@GA. Ως εκ τούτου, εξετάστηκε το αντίκτυπο δευτεριωμένου νερού (D_2O), δευτεριωμένης μεθανόλης (CD_3OD) και της χρήσης υδροξειδίου του νατρίου ($NaOH$) στην αποτελεσματικότητα HAT του SFd@GA.

Όπως απεικονίζεται στην **Εικόνα 3-37**, αντικαθιστώντας 100 μ l μεθανόλης ($MeOH$) στο πείραμα ελέγχου, το οποίο αποτελείται αποκλειστικά από $MeOH$ ως διαλύτη, με 100 μ l υδατικού διαλύματος υδροξειδίου του νατρίου ($NaOH$) 1M (τελική συγκέντρωση: 33.33 mM $NaOH$), αυτό είχε ως αποτέλεσμα αξιοσημείωτη ενίσχυση της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας του SFd@GA, οδηγώντας σε εξουδετέρωση 4.1 μ mol ριζών DPPH (μωβ μπάρα στην **Εικόνα 3-37**) σε σύγκριση με 3.64 μ mol ριζών DPPH που εξουδετερώθηκαν από το ίδιο SFd@GA σε καθαρή $MeOH$ (μπλε μπάρα στην **Εικόνα 3-37**). Η παρατήρηση αυτή υποδηλώνει τη συμμετοχή δικτύου δεσμών υδρογόνου που σχηματίζεται μεταξύ των ομάδων υδροξυλίου (OH) του γαλλικού οξέος (GA) και των πρωτεϊνικών θέσεων. Η παρουσία μέτριας αλκαλικότητας, δηλαδή $NaOH$ στο $MeOH$, προκαλεί ψευδοαλκαλικό αποτέλεσμα, διευκολύνοντας έτσι τον μηχανισμό μεταφοράς ατόμων υδρογόνου (HAT) και ενισχύοντας την αντιοξειδωτική δράση του SFd@GA.

Για να διερευνηθεί η επίδραση του νερού (H_2O) και της μεθανόλης ($MeOH$) στη διαδικασία Μεταφοράς Ατόμων Υδρογόνου (HAT), χρησιμοποιήθηκε δευτεριωμένο νερό (D_2O) ή δευτεριωμένη μεθανόλη (CD_3OD). Όταν 100 μ L D_2O εισήχθησαν στον διαλύτη $MeOH$, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της αντιοξειδωτικής δράσης του SFd@GA, με αποτέλεσμα την εξουδετέρωση 2.33 μ mol ριζών DPPH (πράσινη μπάρα στην **Εικόνα 3-37**).

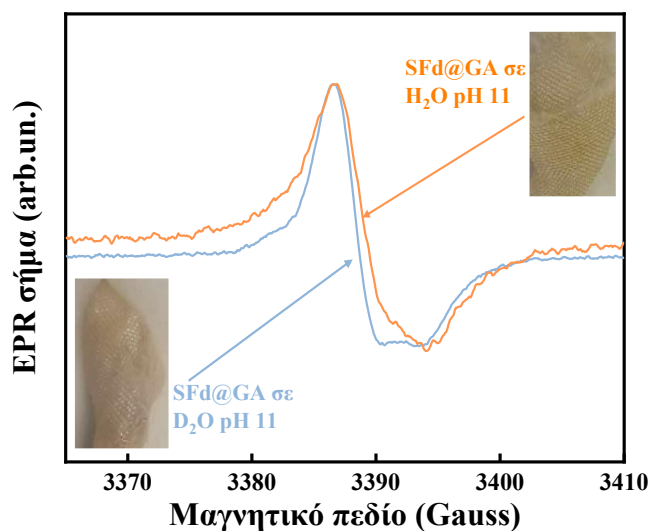


Εικόνα 3-37. Απεικόνιση της διακύμανσης της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας του SFd@GA σε διάφορους διαλύτες.

Αυτό υποδηλώνει ότι η παρουσία ατόμων δευτερίου στο διάλυμα επηρεάζει τη διαδικασία HAT. Το εύρημα αυτό υποστηρίζεται περαιτέρω από τη φασματοσκοπία EPR. Στην **Εικόνα 3-38**, είναι εμφανές ότι οι ρίζες γαλλικού οξέος (GA) που σχηματίζονται στο SFd@GA σε δευτεριωμένο νερό (D₂O) παρουσιάζουν στενότερα εύρη γραμμής σε σύγκριση με τις ρίζες που σχηματίζονται στο SFd@GA σε νερό (H₂O). Αυτό το φαινόμενο στένωσης αποδίδεται στη χαμηλότερη τιμή g των ιόντων δευτερίου (D), όπου $g_n(D)=1.44$ σε σύγκριση με $g_n(H)=14.4$, παρέχοντας άμεση απόδειξη ότι άτομα δευτερίου είναι παρόντα κοντά στις ρίζες γαλλικού οξέος. Η παρατήρηση αυτή ευθυγραμμίζεται με προηγούμενα ευρήματα σχετικά με ανίχνευση ριζών τυροσίνης σε συστήματα D₂O/H₂O ²⁷².

Για τη διεξαγωγή του πειράματος δευτερίου, το υβριδικό υλικό SFd@GA βυθίστηκε σε διάλυμα που περιείχε D₂O/NaOH σε συγκέντρωση 18 mM (pH 11) για διάρκεια 15 λεπτών. Στη συνέχεια, το δείγμα SFd@GA ξηράθηκε στον αέρα υπό συνθήκες ατμοσφαιρικού οξυγόνου και έπειτα τοποθετήθηκε σε σωλήνα 5 mm για τη μέτρησή του με χρήση φασματοσκοπίας EPR. Μετά την ανάλυση EPR, το φάσμα του συγκρίθηκε με εκείνο του SFd@GA σε αλκαλικό μέσο που περιέχει H₂O/NaOH (pH 11) για την εξαγωγή συμπερασμάτων. Οι μετρήσεις EPR

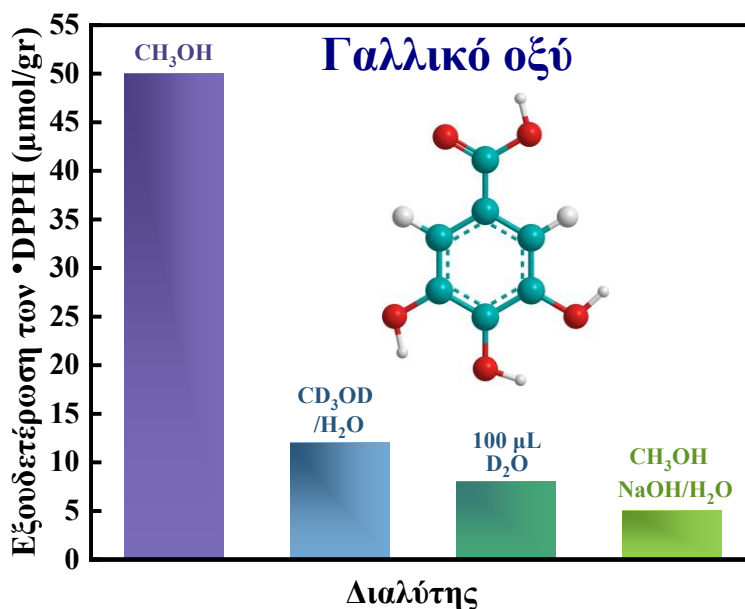
πραγματοποιήθηκαν σε τυπικές συνθήκες θερμοκρασίας δωματίου, ενώ στην **Εικόνα 3-38** απεικονίζονται τα φάσματα EPR που προέκυψαν από τα παραπάνω πειράματα.



Εικόνα 3-38. Φάσματα EPR για το υβριδικό υλικό SFd@GA σε αλκαλικό περιβάλλον που απεικονίζονται ως εξής: το φάσμα που λαμβάνεται σε pH 11 με νερό (H₂O) παρίσταται με την πορτοκαλί γραμμή, ενώ το φάσμα που λαμβάνεται σε pH 11 με οξείδιο του δευτερίου (D₂O) απεικονίζεται με την γαλάζια γραμμή.

Αντικατάσταση της μεθανόλης με πλήρως δευτεριωμένη μεθανόλη CD₃OD είχε ως αποτέλεσμα σημαντική μείωση της αντιοξειδωτικής δράσης του SFd@GA, με μόνο 1.44 μ mol ριζών DPPH να εξουδετερώνονται (απεικονίζεται με την ανοιχτή πράσινη μπάρα στην **Εικόνα 3-37**). Η παρατήρηση αυτή είναι σε συμφωνία με την ιδέα ότι ο μηχανισμός Μεταφοράς Ατόμων Υδρογόνου (HAT) παρεμποδίζεται όταν χρησιμοποιούνται δευτεριωμένοι διαλύτες, οδηγώντας σε αντίστοιχη αναστολή της αντιοξειδωτικής δράσης του SFd@GA. Το αντίκτυπο της εισαγωγής μόνο 100 μ L D₂O, είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της αντιοξειδωτικής δράσης του SFd@GA, το οποίο μπορεί να υποδηλώνει μερική αντικατάσταση των ατόμων υδρογόνου των υδροξυλικών ομάδων του γαλλικού οξέος με δευτέριο. Τέλος, όταν αξιολογήθηκε η αντιοξειδωτική δράση του υβριδικού υλικού SFd@GA σε CD₃OD/H₂O (1:1 v/v), η ικανότητα εξουδετέρωσης των DPPH ήταν πρακτικά αμελητέα.

Τα αντίστοιχα πειράματα ελέγχου που πραγματοποιήθηκαν με το ελεύθερο μόριο του γαλλικού οξέος για λόγους σύγκρισης παρουσιάζονται στην **Εικόνα 3-39**. Συνεπώς, στην περίπτωση του γαλλικού οξέος, η επίδραση μόνο 100 μL D_2O είχε ως αποτέλεσμα μια ισχυρή μείωση της αντιοξειδωτικής-HAT δραστηριότητας του γαλλικού οξέος, ισχυρότερη από ό,τι για το SFd@GA, γεγονός που υποδηλώνει μεγαλύτερη αντικατάσταση των υδροξυλικών υδρογόνων του γαλλικού οξέος από δευτέριο όταν το γαλλικό οξύ βρίσκεται διαλυμένο σε ομογενή φάση στο διάλυμα. Στο υβριδικό υλικό SFd@GA η μήτρα ινών ασκεί πιθανότατα ένα είδος προστασίας έναντι της δευτεριοποίησης των άκρων OH, άρα μικρότερη κινητική-ισοτοπική επιβράδυνση της διαδικασίας HAT.



Εικόνα 3-39. Απεικόνιση της εξάρτησης της αντιοξειδωτικής δράσης του γαλλικού οξέος (GA) σε διάφορους διαλύτες.

Συνολικά, τα παρόντα ευρήματα αναδεικνύουν διάφορα βασικά σημεία: [i] Η επίδραση του διαλύτη, ιδίως η κινητική-ισοτοπική καθυστέρηση που προκύπτει από την δευτεροποίηση των υδροξυλομάδων (OH), έχει επιζήμιο αντίκτυπο στην αποτελεσματικότητα της Μεταφοράς Ατόμων Υδρογόνου (HAT) του γαλλικού οξέος (GA). Τα άτομα δευτερίου παρεμποδίζουν τη διαδικασία HAT. [ii] Η παρουσία της μεταξωτής μήτρας στο SFd@GA προσφέρει ένα προστατευτικό μικροπεριβάλλον για το εμβολιασμένο γαλλικό οξύ, μετριάζοντας τις βλαβερές συνέπειες της δευτερίωσης. Κατά συνέπεια, η επίδραση των ατόμων δευτερίου αμβλύνεται από τη μεταξωτή μήτρα. [iii] Η ήπια αλκαλικότητα, όπως αυτή που προκαλείται από το υδροξείδιο του

νατρίου (NaOH), φαίνεται να διευκολύνει τον μηχανισμό HAT, ενδεχομένως διαταράσσοντας βασικούς δεσμούς υδρογόνου.

3.2.7. Συμπεράσματα

Επιτυχής σύνθεση τεσσάρων καινοτόμων αντιοξειδωτικών υβριδικών υλικών μέσω ομοιοπολικής τροποποίησης της επιφάνειας του αποκομμωμένου μεταξιού SFd: SFd@GLA, SFd@GLAM, το διπλά εμβολιασμένο GLA@SFd@GLAM και το SFd@GA. Η εκτενής διερεύνηση της αντιοξειδωτικής τους αποτελεσματικότητας στη μεταφορά ατόμων υδρογόνου (HAT) αποκαλύπτει μια αξιοσημείωτη ενίσχυση της αντιοξειδωτικής δράσης όλων των υβριδικών υλικών σε σύγκριση τόσο με το SF όσο και με το SFd (**Εικόνα 3-40**).

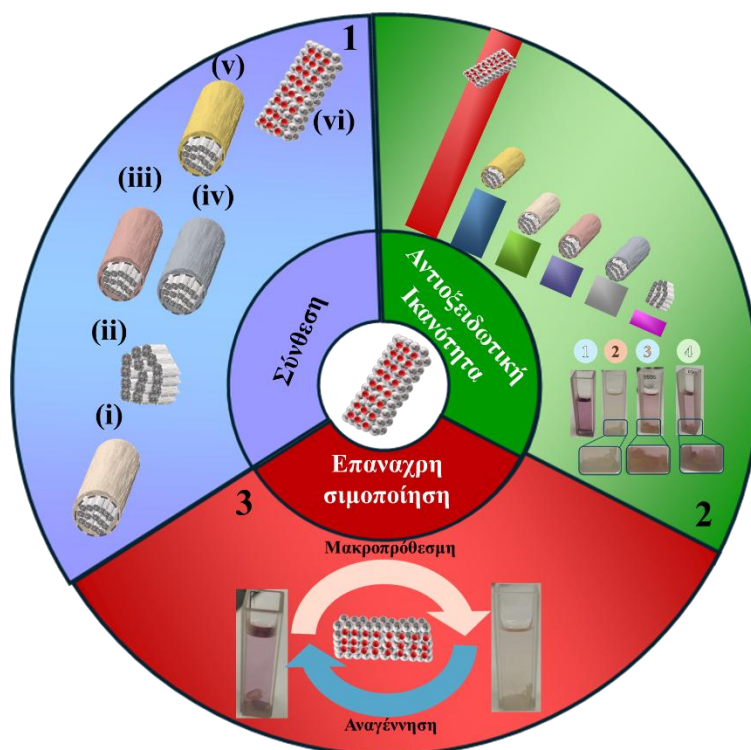
Καλύτερη αντιοξειδωτική δράση HAT από όλα αντιοξειδωτικά υβριδικά υλικά εμφανίζει το SFd@GA και ακολουθεί το διπλά εμβολιασμένο GLA@SFd@GLAM. Συγκεκριμένα, το SFd@GA επιδεικνύει **5.5πλάσια αύξηση της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας HAT** σε σύγκριση με το SF, και **14πλάσια αύξηση σε σύγκριση με το SFd**, καθώς το διπλά εμβολιασμένο GLA@SFd@GLAM παρουσιάζει **1.6πλάσια αύξηση της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας HAT** σε σύγκριση με το SF, και **4.1πλάσια αύξηση σε σύγκριση με το SFd**. Η αυξημένη αντιοξειδωτική δραστηριότητα του SFd@GA αποδίδεται στον μηχανισμό όπου οι ομάδες υδροξυλίου (OH) του γαλλικού οξέος αλληλεπιδρούν με το 2,2-διφαινυλο-1-πικρυλ-υδραζύλιο (DPPH) μέσω του μηχανισμού Μεταφοράς Ατόμων Υδρογόνου (HAT). Το κύριο επίτευγμα αυτής της μελέτης έγκειται στην επίτευξη της **συνεχούς επαναχρησιμοποίησης των υβριδικών υλικών SFd@GA, GLA@SFd@GLAM, SFd@GLA και SFd@GLAM για μακροχρόνιες επαναλαμβανόμενες χρήσεις**. Μια ολοκληρωμένη διερεύνηση των μηχανιστικών πτυχών αποκάλυψε διάφορα βασικά ευρήματα σε ότι αφορά το υβριδικό υλικό του SFd@GA:

[i] Η παρατεταμένη δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης του SFd@GA αποδίδεται στη μοναδική ικανότητά του να αναγεννάται μέσω ταχείας ξήρανσης σε συνθήκες ατμοσφαιρικού αέρα.

[ii] Το φαινόμενο αυτό συσχετίζεται με τον ακριβή έλεγχο που ασκείται στον πληθυσμό των ομάδων υδροξυλίου (OH) του γαλλικού οξέος από τη μεταξωτή μήτρα, που πιθανώς

διευκολύνεται μέσω αλληλεπιδράσεων δεσμών υδρογόνου.

[iii] Επιπλέον, η μεταξωτή μήτρα επιδεικνύει ικανότητα να συνδιαμορφώνει τις ιδιότητες των δεσμών OH σε διάφορα διαλυτικά μέσα, συμπεριλαμβανομένων φαινομένων ισοτοπικής υποκατάστασης. Κατά συνέπεια, το υβριδικό υλικό SFd@GA αναδεικνύεται ως ένα εξέχον παράδειγμα σε μια αναδυόμενη κατηγορία υλικών που διακρίνονται για την ικανότητά τους να παρέχουν συνεχή αντιοξειδωτική-HAT δραστηριότητα κατά παραγγελία (on demand) (Εικόνα 3-40).



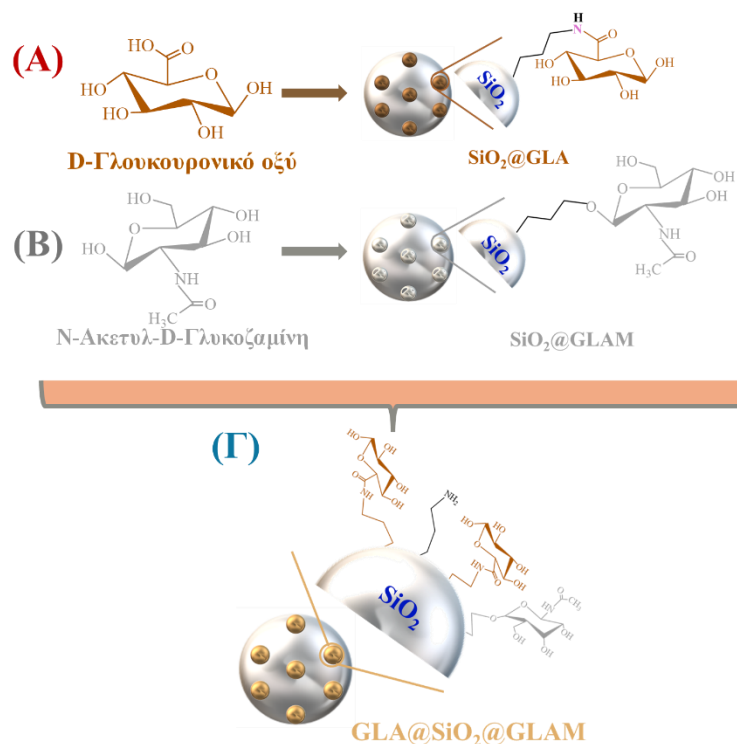
Εικόνα 3-40. Σχηματική αναπαράσταση των συμπερασμάτων των δύο κεφαλαίων: 1. Σύνθεση των αντιοξειδωτικών υβριδικών υλικών SFd@GLA, SFd@GLAM, GLA@SFd@GLAM και SFd@GA. 2. Αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής τους δράσης έναντι των ριζών DPPH και 3. Ικανότητα επαναχρησιμοποίησης όλων των υβριδικών υλικών.

**Κεφάλαιο 3: Τρίτο Μέρος: Αξιολόγηση του
τρόπου αλληλεπίδρασης των υβριδικών υλικών
SiO₂@GLA, SiO₂@GLAM, GLA@
SiO₂@GLAM και SiO₂@GA καθώς και των
υβριδικών υλικών SFd@GLA, SFd@GLAM,
GLA@SFd@GLAM και SFd@GA, έναντι των
ριζών υδροξυλίου •OH, μέσω EPR**

3.3. Μέλετη της αντιοξειδωτικής ικανότητας των υβριδικών υλικών SiO₂@GA, SiO₂@GLA, SiO₂@GLAM και GLA@SiO₂@GLAM, έναντι των ριζών OH, καθώς και συγκριτική μελέτη σε σχέση με την αντιοξειδωτική τους δράση έναντι των ριζών DPPH.

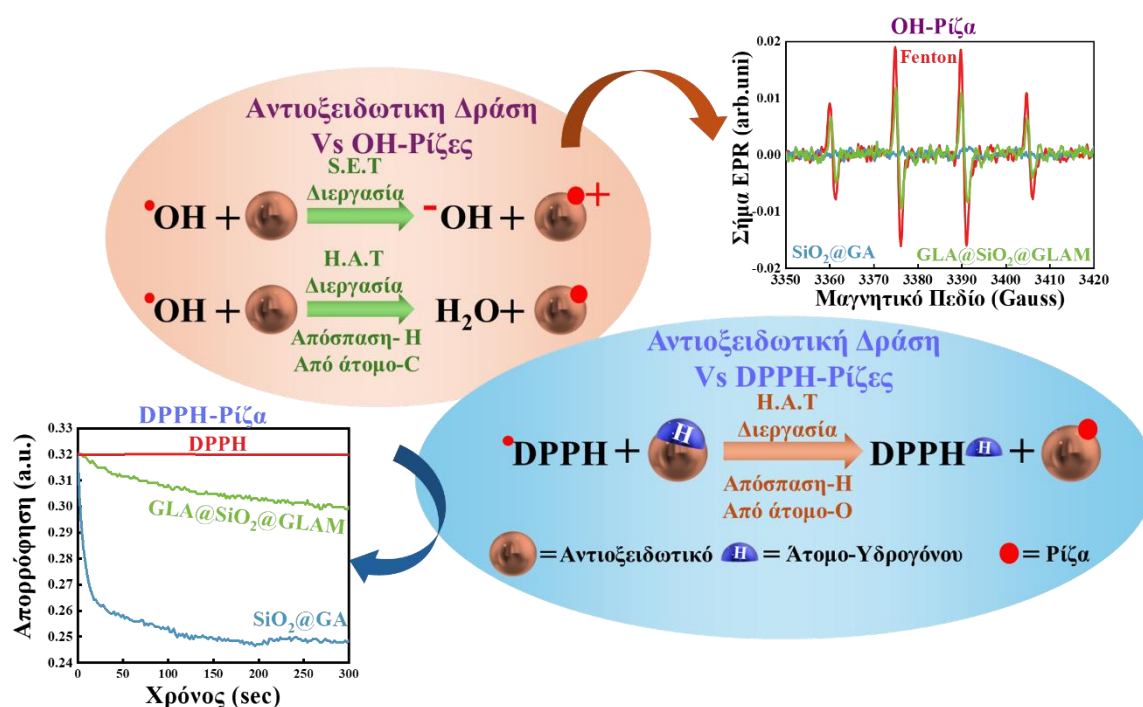
3.3.1. Εισαγωγή

Σε παλιότερη έρευνά μας, δείξαμε ότι μπορούν να συντεθούν υβριδικά αντιοξειδωτικά υλικά χρησιμοποιώντας σίλικα ως υλικό υποστήριξης και ενσωματώνοντας πάνω στην επιφάνειά της γαλλικό οξύ¹⁰⁶. Κατά τη διάρκεια της μεταπτυχιακής μου διατριβής, οι μονοσακχαρίτες που σχηματίζουν το υαλουρονικό οξύ, δηλαδή το D-Γλুকουρονικό οξύ και η N-ακετυλ-D-γλυκοζαμίνη, ακινητοποιήθηκαν στην επιφάνεια της SiO₂ (**Εικόνα 3-41**)⁸⁷ και μετά από αξιολόγησή τους, βρέθηκε ότι παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση έναντι των ριζών DPPH μέσω μηχανισμού μεταφοράς ατόμων υδρογόνου (HAT)⁸⁷.



Εικόνα 3-41. Δομική αναπαράσταση των υβριδικών υλικών (A) {SiO₂@GLA}, (B) {SiO₂@GLAM} και (Γ) του διπλά εμβολιασμένου {GLA@SiO₂@GLAM} υβριδικού υλικού⁸⁷.

Στο κεφάλαιο 2 είδαμε ότι το μετάξι σαν υλικό υποστήριξης είναι αρκετά περίπλοκο λόγω των αλληλεπιδράσεων και των δεσμών υδρογόνου που δημιουργούνται μεταξύ της μεταξωτής μήτρας και του εκάστοτε αντιοξειδωτικού. Επιπλέον, η μελέτη καθώς και η δημιουργία των ριζών υδροξυλίου είναι πολύ πιο περίπλοκη από αυτή των ριζών DPPH. Βάσει αυτού, αποφασίσαμε αρχικά να μελετήσουμε την αλληλεπίδραση των ριζών OH με υβριδικά υλικά που έχουν ως υλικό υποστήριξης σίλικά (SiO₂). Επίσης, σε αυτό το κεφάλαιο θα πραγματοποιηθεί για πρώτη φορά μια συγκριτική μελέτη των ίδιων υβριδικών υλικών ως προς τη δράση τους έναντι ριζών DPPH και ριζών OH. Παρά την μεγάλη σπουδαιότητα της μελέτης των μηχανισμών εξουδετέρωσης ριζών OH και ριζών μέσω και HAT, η άμεση σύγκριση του ίδιου αντιοξειδωτικού ως προς αυτές τις δύο δράσεις είναι μάλλον σπάνια^{273–275}. Αυτό συνεπάγεται την ανάγκη μιας τέτοιας μελέτης, δηλαδή την κατανόηση των ομοιοτήτων/διαφορών των μηχανισμών δράσης και την αποτελεσματικότητα των δύο διεργασιών (Εικόνα 3-42).



Εικόνα 3-42. Σχηματική αναπαράσταση του σκοπού της παρούσας μελέτης. 1. Μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας των υβριδικών υλικών ως προς τις ρίζες υδροξυλίου, καθώς και του μηχανισμού δράσης τους. 2. Συγκριτική μελέτη των μηχανισμών αντιοξειδωτικής δράσης των ίδιων υβριδικών υλικών τόσο ως προς ρίζες OH όσο και ως προς ρίζες DPPH.

Η μεταφορά ατόμων υδρογόνου (HAT) και η απλή μεταφορά ενός ηλεκτρονίου (SET) είναι δύο θεμελιώδη μονοπάτια για αντιοξειδωτικές διεργασίες μέσω εξουδετέρωσης ριζών, ωστόσο δεν υπάρχει συστηματική ταυτόχρονη αξιολόγησή τους για το ίδιο σύστημα. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή παρουσιάζουμε μια συγκριτική μελέτη των διεργασιών HAT και SET που εφαρμόζεται για μια δέσμη καλά χαρακτηρισμένων υβριδικών υλικών $\text{SiO}_2@\text{GA}$, $\text{SiO}_2@\text{GLA}$, $\text{SiO}_2@\text{GLAM}$ και $\{\text{GLA}@\text{SiO}_2@\text{GLAM}\}$ με μοριακή αναλογία $[\text{GLA}:\text{GLAM}]$ [2:1]. Οι ρίζες υδροξυλίου ($\bullet\text{OH}$), που παράγονται από ένα σύστημα Fenton, αντιδρούν μέσω μεταφοράς ενός ηλεκτρονίου (SET) και μεταφοράς ενός ατόμου υδρογόνου (HAT) από άτομα οξυγόνου και άνθρακα αντίστοιχα, ενώ η ρίζα DPPH αντιδρά μέσω HAT με μεταφορά ατόμου υδρογόνου από άτομα οξυγόνου όπως θα καταδειχθεί ευθύς παρακάτω. Η φασματοσκοπία EPR, η οποία είναι εξαιρετικά κατάλληλη για επιτόπια ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των ελεύθερων ριζών, χρησιμοποιήθηκε ως ένα σύγχρονο εργαλείο για την παρακολούθηση των ριζών $\bullet\text{OH}$ με τη μέθοδο παγίδευσης των σπιν.

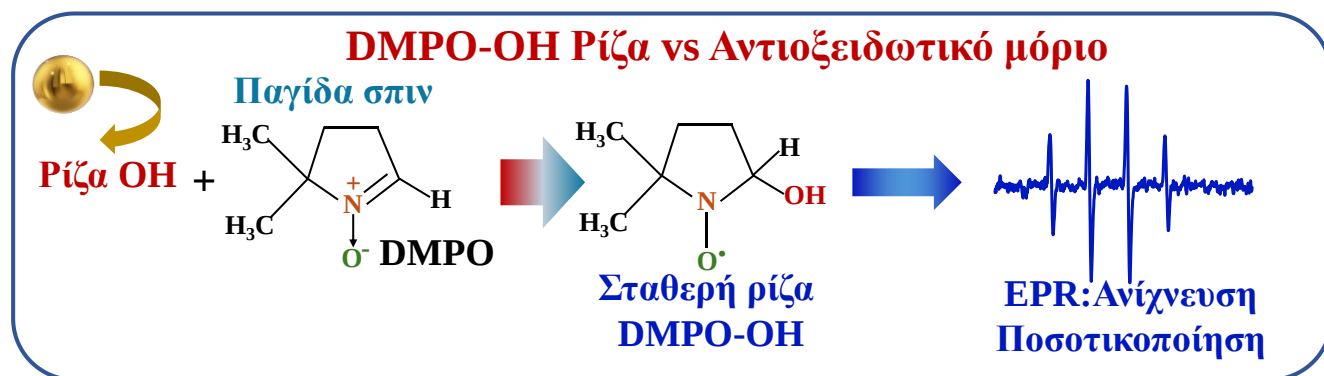
Ως εκ τούτου οι στόχοι του παρόντος κεφαλαίου ήταν: [i] μελέτη των υβριδικών υλικών $\text{SiO}_2@\text{GA}$, $\text{SiO}_2@\text{GLA}$, $\text{SiO}_2@\text{GLAM}$ και $\text{GLA}@\text{SiO}_2@\text{GLAM}$ ως προς την ικανότητά τους να εξουδετερώνουν τις ρίζες υδροξυλίου ($\bullet\text{OH}$) και [ii] σύγκριση της αποτελεσματικότητας εξουδετέρωσης ριζών OH έναντι αυτής ριζών DPPH μέσω HAT.

3.3.2. Σύνθεση των υβριδικών υλικών $\text{SiO}_2@\text{GA}$, $\text{SiO}_2@\text{GLA}$, $\text{SiO}_2@\text{GLAM}$ και του διπλά εμβολιασμένου $\text{GLA}@\text{SiO}_2@\text{GLAM}$.

Η σύνθεση των υβριδικών υλικών έχει αναφερθεί εκτενώς στην μεταπτυχιακή μου διατριβή. Τα βασικά βήματα περιλαμβάνουν την ακινητοποίηση των οργανικών μορίων: γαλλικό οξύ (GA), D-Γλυκουρονικό οξύ (GLA) και N-Ακετυλ- D-Γλυκοζαμίνη (GLAM) στην επιφάνεια της σίλικα (SiO_2) μέσω της μεθοδολογίας sol-gel, η οποία προχωρά μέσω του μεταβατικού σχηματισμού μια πρόδρομης ένωσης σιλανίου. Η υδρόλυση και η συμπύκνωση στις επιφανειακές θέσεις της σίλικα έχουν ως αποτέλεσμα τη σύνθεση των υβριδικών υλικών $\text{SiO}_2@\text{GA}$, $\text{SiO}_2@\text{GLA}$ και $\text{SiO}_2@\text{GLAM}$. Για τη σύνθεση του διπλά εμβολιασμένου υβριδικού υλικού, τόσο το D-Γλυκουρονικό οξύ (GLA) όσο και η N-ακετυλ-D-γλυκοζαμίνη (GLAM) ακινητοποιούνται στην επιφάνεια ίδιας σίλικα με μοριακή αναλογία $[\text{GLA}:\text{GLAM}]$ [2:1]^{87,106}.

3.3.3. Αξιολόγηση της ικανότητας εξουδετέρωσης ριζών υδροξυλίου ($\bullet\text{OH}$)

Η αξιολόγηση της ικανότητας εξουδετέρωσης ριζών υδροξυλίου για όλα τα υβριδικά υλικά και τα αντίστοιχα μονομερή τους πραγματοποιήθηκε με τη χρήση φασματοσκοπίας EPR. Η ελεγχόμενη παραγωγή ριζών υδροξυλίου ($\bullet\text{OH}$) επιτυγχάνεται μέσω της αντίδρασης Fenton ²⁷⁶. Οι ρίζες υδροξυλίου παράγονται εντός υδατικού διαλύματος που περιλαμβάνει ιόντα σιδήρου (Fe^{III}) και υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2). Για να ξεκινήσει η παραγωγή ριζών υδροξυλίου ($\bullet\text{OH}$), το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) με συγκέντρωση $\text{C}=50\text{mM}$ αλληλεπιδρά με υδατικό διάλυμα Fe^{II} (FeSO_4)* $7\text{H}_2\text{O}$ ($1\mu\text{M}$) σε $\text{pH}=6.7$. Οι σχηματιζόμενες ρίζες OH παγιδεύονται με τη χρήση 6.67mM (DMPO) N-οξειδίου (5,5-διμεθυλο-1-πυρρολίνης) ²⁷⁷, σύμφωνα με την **Εικόνα 3-43**. Ο συνολικός όγκος του διαλύματος είναι 3 ml , από τον οποίο $20\text{ }\mu\text{L}$ μεταφέρονται σε γυάλινους τριχοειδείς σωλήνες και τοποθετούνται στο φασματοφωτόμετρο EPR για μέτρηση. Σύμφωνα με τους Lloyd et al ²⁷⁸, η διαδικασία παγίδευσης-σπιν των OH από το DMPO σε σύστημα Fenton προχωρά μέσω ενός γρήγορου, επιλεκτικού σχηματισμού του είδους $\text{DMPO-OH}\bullet$ το οποίο εμφανίζει ένα μοτίβο τεσσάρων κορυφών με εντάσεις $1:2:2:1$ ²⁷⁸ (**Εικόνα 3-43**).



Εικόνα 3-43. Η εξουδετέρωση ριζών υδροξυλίου μπορεί να μελετηθεί *in situ* με τη χρήση φασματοσκοπίας EPR με τεχνικές ταχείας παγίδευσης σπιν, χρησιμοποιώντας το DMPO ως μόριο- παγίδα.

3.3.3.1. Μεθοδολογία παρακολούθησης των ριζών OH

Η παραγωγή ριζών OH μέσω του συστήματος Fe/H₂O₂ της αντίδρασης Fenton είναι γνωστή ^{253,254,276} και περιλαμβάνει πολλά ενδιάμεσα στάδια που συμβαίνουν μέσω οξειδοαναγωγικών κύκλων Fe²⁺/Fe³⁺ ²⁵³ και μετασχηματισμών H₂O₂/OH-ριζών. Εδώ, για να αποφύγουμε περιττές περιπλοκές, επικεντρωθήκαμε αποκλειστικά στο σχηματισμό •OH. Έτσι, πριν από την προσθήκη οποιουδήποτε αντιοξειδωτικού, το H₂O₂ και ο σίδηρος αφήνονται να αντιδράσουν για 30 δευτερόλεπτα στους 25 °C. Λεπτομερή πειράματα με παρακολούθηση μέσω EPR των παραγόμενων ριζών DMPO-OH• έδειξαν ότι στα 30sec ο σχηματισμένος πληθυσμός •OH φτάνει σε σταθερή συγκέντρωση στα 4.15μM. Όταν δεν πραγματοποιείται προσθήκη του αντιοξειδωτικού, ο πληθυσμός DMPO-OH• παραμένει σταθερός για 15-20 λεπτά. Έτσι, χρησιμοποιώντας αυτό το χρονικό παράθυρο, η προσθήκη των αντιοξειδωτικών στα 30 δευτερόλεπτα παρέχει αναπαραγωγίμες, ποσοτικές μετρήσεις των πληθυσμών •OH. Ένα άλλο κρίσιμο βήμα που εξετάστηκε ήταν η ακολουθία προσθήκης του αντιοξειδωτικού / (DMPO) παγίδας σπιν. Υπογραμμίζεται ότι η σωστή ακολουθία είναι η παρουσιαζόμενη στην **Εικόνα 3-43**: [1] σχηματισμός των ριζών OH από το σύστημα Fenton Fe/H₂O₂ → 30 sec εξέλιξης, [2] προσθήκη του αντιοξειδωτικού → χρόνος για να δράσει το αντιοξειδωτικό, [3] προσθήκη DMPO για την παγίδευση των ριζών OH που παραμένουν. Η ποσοτική ανάλυση των ριζών υδροξυλίου πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του DPPH (1,1-διφαινυλο-2-πικρυλ-υδραζύλιο) ως πρότυπο σπιν ^{276,279}, παράλληλα με υπολογισμό του διπλού ολοκληρώματος των σημάτων EPR ²⁷⁷.

Οι ολικές ρίζες OH, που σχηματίζονται από την αντίδραση Fenton, OH_{total}, και οι μη εξουδετερωμένες ρίζες που παραμένουν μετά την προσθήκη των αντιοξειδωτικών υλικών, δηλαδή των υβριδικών υλικών SiO₂@GA, SiO₂@GLA, SiO₂@GLAM και GLA@SiO₂@GLAM καθώς και των μονομερών τους ποσοτικοποιήθηκαν με τη χρήση φασματοσκοπίας EPR. Τέλος, οι ρίζες OH που εξουδετερώθηκαν υπολογίστηκαν ανάλογα.

$$(\bullet\text{OH}_{\text{εξουδετερωμένες από τα υβριδικά υλικά}}) = (\bullet\text{OH}_{\text{ολικά}}) - (\bullet\text{OH}_{\text{μη-εξουδετερωμένες}}),$$

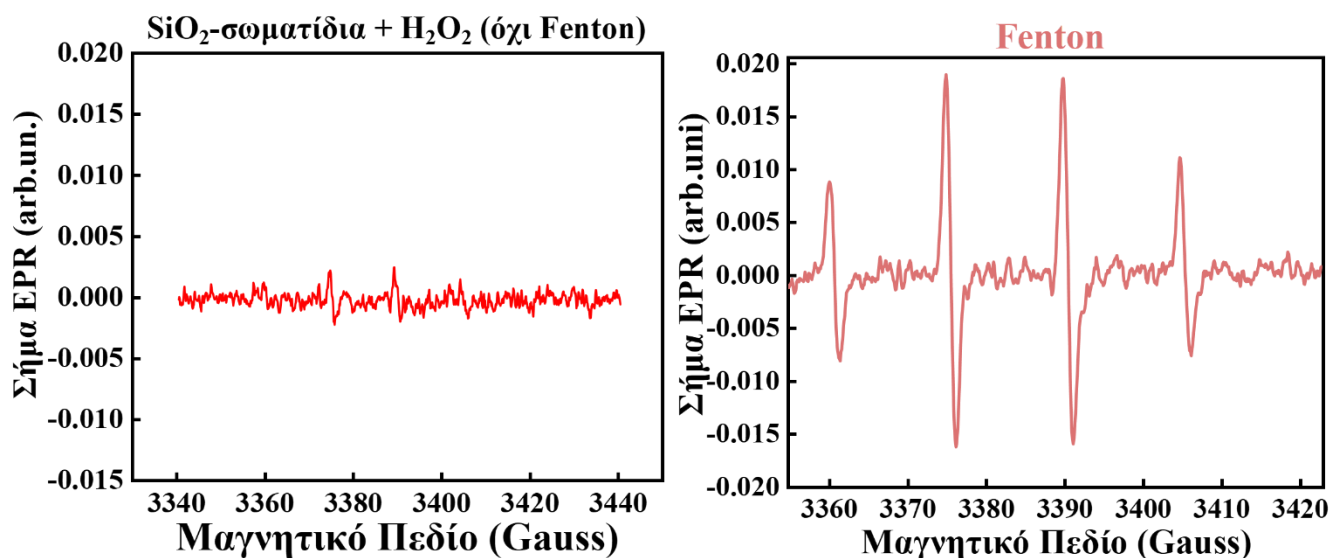
$$\text{ο λόγος } n = (\text{moles } \bullet\text{OH}_{\text{εξουδετερωμένες}}) / (\text{moles GA, GLA, GLAM})$$

υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας τα mol GA, GLA και GLAM ανά μάζα υλικών SiO₂@GA, SiO₂@GLA, SiO₂@GLAM και GLA@SiO₂@GLAM και προσδιορίστηκαν από την ανάλυση TGA που πραγματοποιήθηκε κατά τη διάρκεια εκπόνησης της μεταπτυχιακής μου διατριβής.

3.3.4. Πειραματικά Αποτελέσματα αξιολόγησης της ικανότητας εξουδετέρωσης των ριζών υδροξυλίου ($\bullet\text{OH}$)

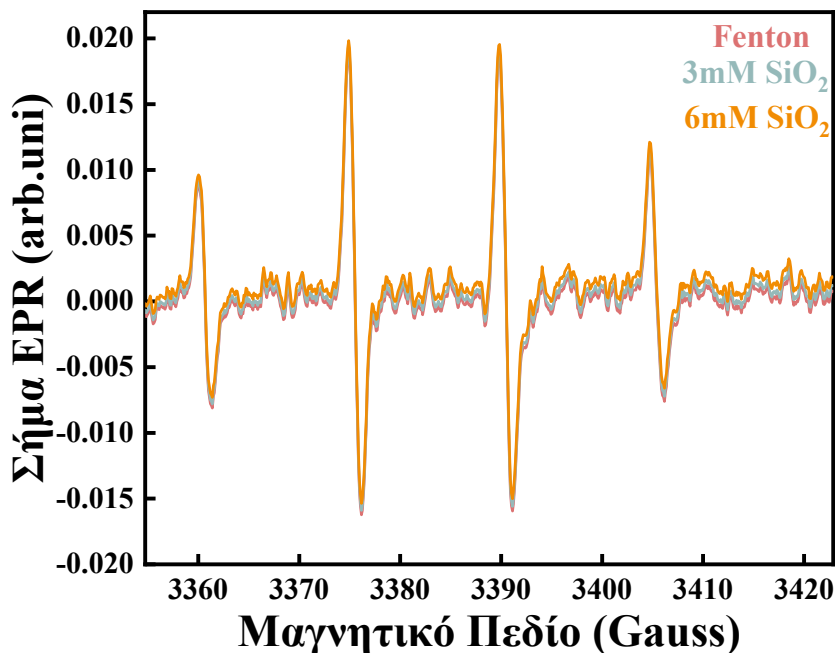
Το διάλυμα που περιέχει ρίζες $\text{DMPO-OH}\bullet$ παρουσιάζει ένα χαρακτηριστικό φάσμα EPR τεσσάρων γραμμών που χαρακτηρίζεται από ένα μοτίβο κορυφών με εντάσεις 1:2:2:1 (**Εικόνα 3-43**)^{280–283}. Η εισαγωγή αντιοξειδωτικών οδηγεί στην απόσβεση των $\bullet\text{OH}$, όπως αποδεικνύεται από τη μείωση της έντασης των κορυφών που παρατηρείται στα φάσματα EPR. Στα παρόντα πειράματα δεν ανιχνεύθηκαν άλλες δευτερεύουσες ρίζες.

Για να είμαστε σίγουροι ότι τα σωματίδια SiO_2 δεν παράγουν ρίζες $\text{OH}\cdot$, πραγματοποιήσαμε ένα πείραμα ελέγχου, όπου τα σωματίδια SiO_2 αφέθηκαν να αντιδράσουν με το H_2O_2 και είδαμε ότι παράγουν ασήμαντες συγκεντρώσεις ριζών $\text{OH}\cdot$, δηλαδή της τάξης των 10^{-2} μM (**Εικόνα 3-44**). Αυτό είναι αμελητέο, σε σύγκριση με τις $\bullet\text{OH}$ που παράγονται από την αντίδραση Fenton, >4 μM (**Εικόνα 3-44**).



Εικόνα 3-44. Αριστερά φαίνεται το φάσμα EPR για τις ρίζες $\text{OH}\cdot$ που παράγονται από τα SiO_2 -σωματίδια, ενώ δεξιά φαίνεται το φάσμα EPR των ριζών $\text{OH}\cdot$ που παράγονται από την αντίδραση Fenton.

Επιπλέον, ως άλλο ένα πείραμα ελέγχου η σίλικα προστίθεται στην αντίδραση Fenton (H_2O_2 , Fe^{2+}) με την ίδια ακριβώς πορεία που αλληλεπιδρούν τα αντιοξειδωτικά υλικά. Αυτό το πείραμα πραγματοποιείται για να αποδειχθεί ότι η σίλικα ως υλικό υποστρώματος δεν παρέχει καμία αλληλεπίδραση με τις ρίζες $\text{OH}\cdot$. Όπως αναμενόταν και όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 3-45** η σίλικα δεν παρέχει καμία εξουδετέρωση των ριζών $\text{OH}\cdot$, καθώς δεν παρατηρείται καμία αλλαγή στο φάσμα των $\cdot\text{OH}$ στο EPR (**Εικόνα 3-45**).



Εικόνα 3-45. Φάσμα EPR, που αποδεικνύει την αμελητέα επίδραση της SiO_2 στη εξουδετέρωση των ριζών υδροξυλίου.

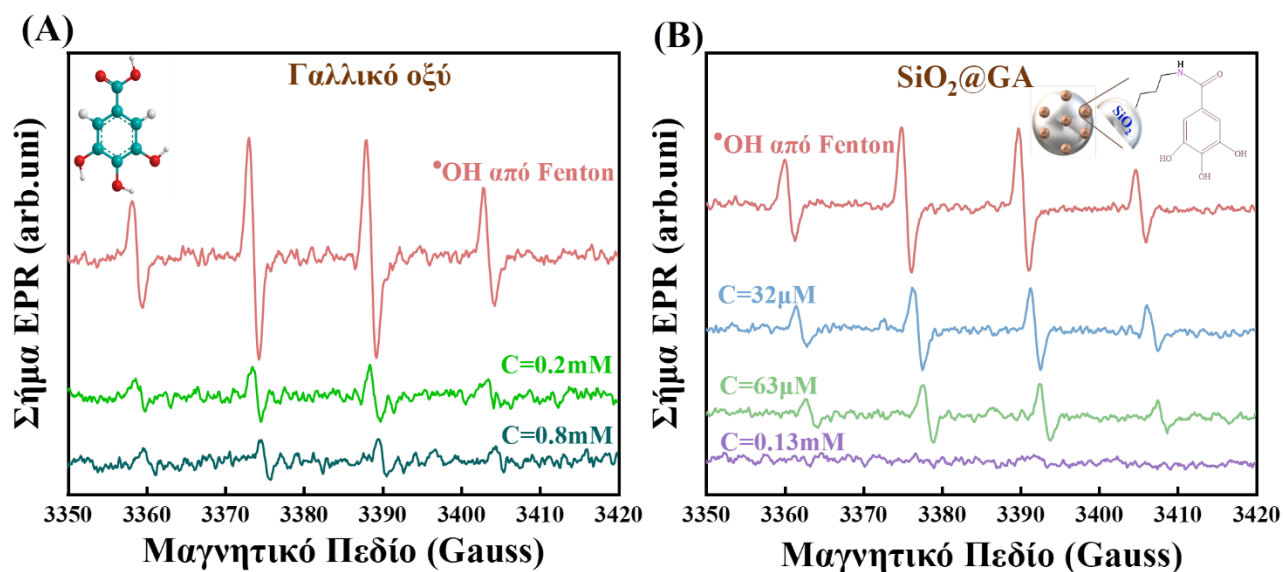
3.3.4.1. Αξιολόγηση της ικανότητας εξουδετέρωσης των ριζών $\text{OH}\cdot$ από το γαλλικό οξύ και το $\text{SiO}_2@\text{GA}$

Για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής αποτελεσματικότητας του ελεύθερου γαλλικού οξέος και του υβριδικού υλικού $\text{SiO}_2@\text{GA}$, εκτελέστηκε το πειραματικό πρωτόκολλο που περιγράφεται στην ενότητα 3.3.3.1. Το ελεύθερο γαλλικό οξύ εισήχθη στο διάλυμα της αντίδρασης Fenton σε συγκεντρώσεις $C=0.2\text{mM}$ και $C=0.8\text{mM}$, ενώ το γαλλικό οξύ που εισήχθη με τη μορφή υβριδικού υλικού $\text{SiO}_2@\text{GA}$ προστέθηκε σε συγκεντρώσεις $C=32\mu\text{M}$, $C=62\mu\text{M}$ και $C=0.13\mu\text{M}$. Στην **Εικόνα 3-46** Α, Β απεικονίζονται τα φάσματα EPR που δείχνουν τη μείωση της

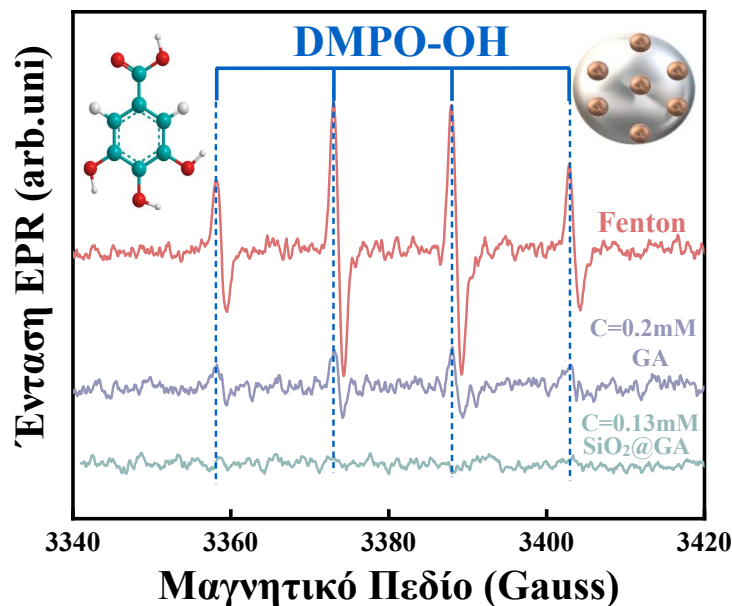
συγκέντρωσης των ριζών $\text{DMPO-OH}^\bullet$ με την προσθήκη ελεύθερου γαλλικού οξέος και του υβριδικού υλικού $\text{SiO}_2@\text{GA}$, αντίστοιχα.

Τα δεδομένα στην **Εικόνα 3-47** αποκαλύπτουν ότι το υβριδικό υλικό $\text{SiO}_2@\text{GA}$ ήταν σε θέση να επιτύχει συγκριτικά μεγαλύτερη εξουδετέρωση $^\bullet\text{OH}$ σε σχέση με το ελεύθερο γαλλικό οξύ, σε πολύ χαμηλότερες συγκεντρώσεις του ακινητοποιημένου γαλλικού οξέος. Η **Εικόνα 3-47** επιτρέπει την άμεση απεικόνιση αυτού του αποτελέσματος, δηλαδή ότι τα 0.2mM ελεύθερου γαλλικού οξέος είναι λιγότερο αποτελεσματικά από ότι τα 0.13mM γαλλικού οξέος που παρέχονται από το υβριδικό υλικό $\text{SiO}_2@\text{GA}$.

Ως εκ τούτου, τα δεδομένα της **Εικόνα 3-47** αποκαλύπτουν ότι η ομοιοπολική σύνδεση του γαλλικού οξέος στην επιφάνεια της σίλικα προσδίδει αυξημένη αντιοξειδωτική δράση στο υβριδικό υλικό έναντι των ριζών υδροξυλίου ($^\bullet\text{OH}$) σε σχέση με το υδατικό διάλυμα γαλλικού οξέος. Συνοπτικά, 1 γραμμάριο GA εμβολιασμένου σε SiO_2 εξουδετερώνει αποτελεσματικά 16.1 mmol ριζών υδροξυλίου ($^\bullet\text{OH}$), ενώ 1 γραμμάριο καθαρού γαλλικού οξέος (GA) εξουδετερώνει 13.2 mmol ριζών OH .



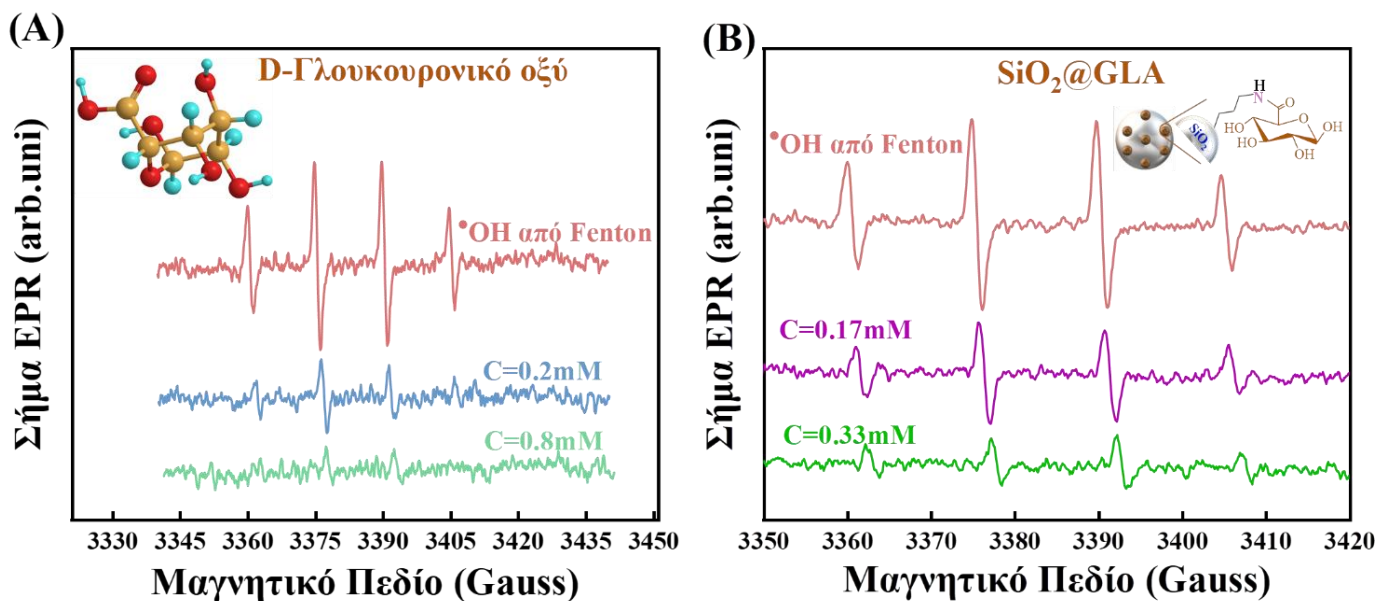
Εικόνα 3-46. Φάσματα EPR, που καταδεικνύουν τη μείωση της συγκέντρωσης των ριζών OH στο διάλυμα παρουσία, (A) γαλλικού οξέος (GA) και (B) $\text{SiO}_2@\text{GA}$. Η κόκκινη γραμμή παρουσιάζει το ίδιο πείραμα χωρίς την προσθήκη αντιοξειδωτικών ειδών.



Εικόνα 3-47. Η σύγκριση των φασμάτων EPR αποκαλύπτει ότι το υβριδικό υλικό SiO₂@GA παρουσιάζει μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα στην εξουδετέρωση των ριζών υδροξυλίου ($\bullet$ OH) σε σύγκριση με το ελεύθερο, μη ακινητοποιημένο γαλλικό οξύ.

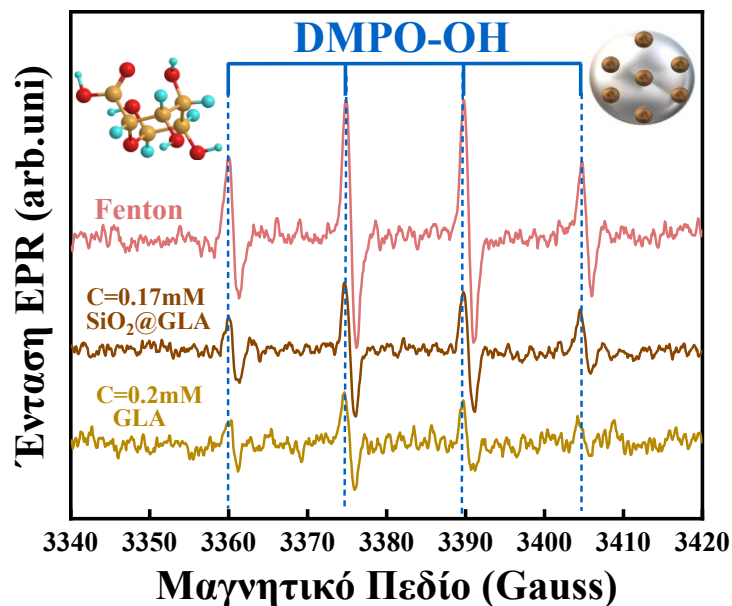
3.3.4.2. Αξιολόγηση της ικανότητας εξουδετέρωσης των ριζών OH από το D-Γλουκουρονικό οξύ και το SiO₂@GLA

Για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής ισχύος του D-γλουκουρονικού οξέος και του αντίστοιχου υβριδικού υλικού SiO₂@GLA, ακολουθήθηκε το πειραματικό πρωτόκολλο που περιγράφεται στην ενότητα 3.3.3.1. Το D-Γλουκουρονικό οξύ προστέθηκε στο διάλυμα της αντίδρασης Fenton σε συγκεντρώσεις C=0.2mM και C=0.8mM, ενώ το ακινητοποιημένο GLA στο υβριδικό υλικό SiO₂@GLA ενσωματώθηκε σε συγκεντρώσεις C=0.17mM και C=0.33mM. Η **Εικόνα 3-48** Α και Β παρακάτω απεικονίζουν σχηματικές αναπαραστάσεις των ριζών DMPO-OH $\bullet$ μετά από προσθήκη του D-γλουκουρονικού οξέος (GLA) και του υβριδικού υλικού SiO₂@GLA, αντίστοιχα.



Εικόνα 3-48. Τα φάσματα EPR απεικονίζουν τη μείωση της συγκέντρωσης των ριζών υδροξυλίου ($\bullet\text{OH}$) στο διάλυμα κατά την εισαγωγή (A) D-γλουκουρονικού οξέος (GLA) και (B) $\text{SiO}_2\text{@GLA}$. Η κόκκινη γραμμή παρουσιάζει το αντίστοιχο πείραμα χωρίς την προσθήκη αντιοξειδωτικού στο διάλυμα.

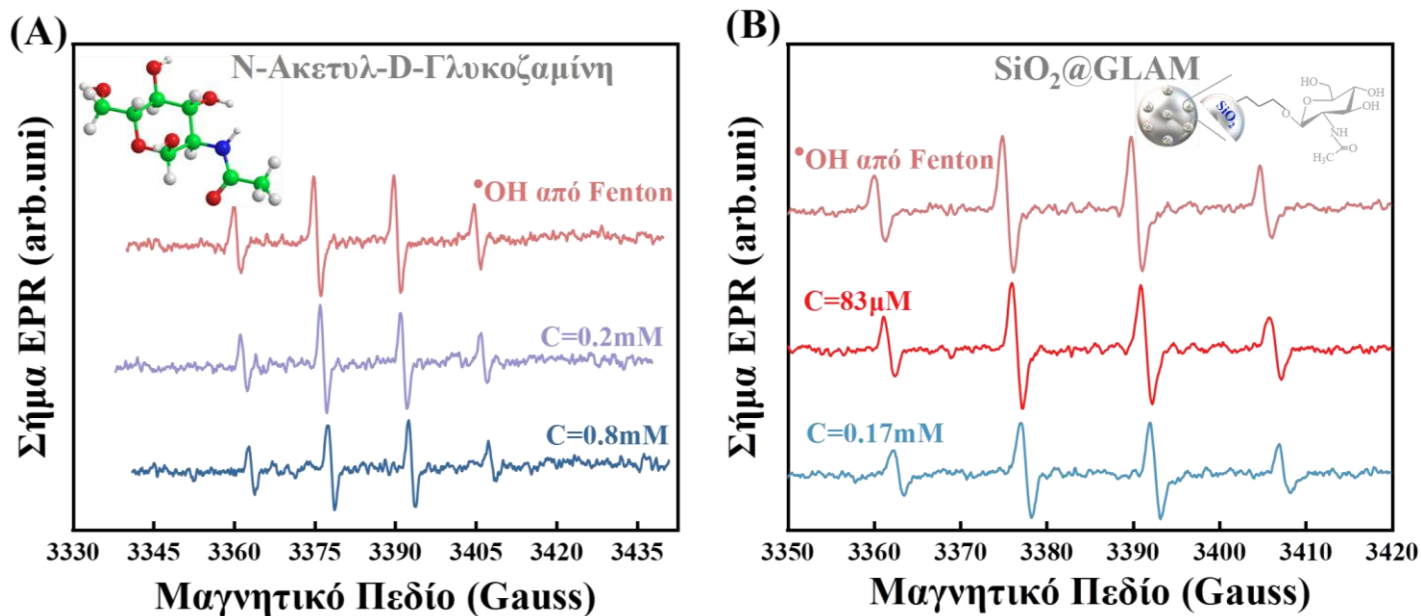
Από τη συγκριτική αξιολόγηση μεταξύ του υβριδικού υλικού $\text{SiO}_2\text{@GLA}$ και του D-γλουκουρονικού οξέος, προκύπτει ένα διαφορετικό μοτίβο σε σύγκριση με αυτό που παρατηρήθηκε με το γαλλικό οξύ και το υβριδικό υλικό $\text{SiO}_2\text{@GA}$. Συγκεκριμένα, η ομοιοπολική σύνδεση του γλουκουρονικού οξέος στην επιφάνεια της SiO_2 οδηγεί σε ελαφρά μείωση της ικανότητας εξουδετέρωσης των $\bullet\text{OH}$ σε σύγκριση με το καθαρό μόριο γλουκουρονικού οξέος (**Εικόνα 3-49**). Η ποσοτική αξιολόγηση των δύο αντιοξειδωτικών αποκάλυψε ότι 1 γραμμάριο D-γλουκουρονικού οξέος μπορεί να εξουδετερώσει αποτελεσματικά 7.4 mmol ριζών $\bullet\text{OH}$, ενώ 1 γραμμάριο GLA ομοιοπολικά συνδεδεμένο στο SiO_2 επιδεικνύει ικανότητα εξουδετέρωσης 6.2 mmol ριζών $\bullet\text{OH}$.



Εικόνα 3-49. Η συγκριτική ανάλυση των φασμάτων EPR δείχνει ότι το υβριδικό υλικό SiO₂@GLA επιδεικνύει ελαφρώς χαμηλότερη αποτελεσματικότητα στην δέσμευση των ριζών υδροξυλίου ($\bullet$ OH) σε σύγκριση με το ελεύθερο μόριο του γλουκουρονικού οξέος.

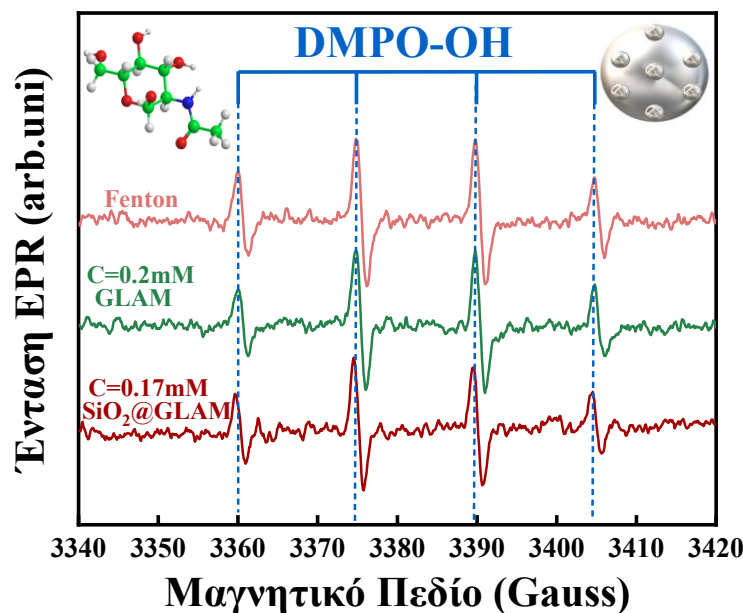
3.3.4.3. Αξιολόγηση της ικανότητας εξουδετέρωσης των ριζών OH από N-Ακετυλ-D-Γλυκοζαμίνη και το SiO₂@GLAM

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η αντιοξειδωτική αξιολόγηση του μονομερούς του υαλουρονικού οξέος N-Ακετυλ-D-Γλυκοζαμίνη και του αντίστοιχου υβριδικού υλικού SiO₂@GLAM. Όπως και στα προηγούμενα πειράματα, το GLAM εισήχθη στο διάλυμα της αντίδρασης Fenton σε συγκεντρώσεις C=0.2mM και C=0.8mM, ενώ η ακινητοποιημένη GLAM μέσω του υβριδικού υλικού SiO₂@GLAM ενσωματώθηκε στην αντίδραση Fenton σε συγκεντρώσεις C=83μM και C=0.17mM. Στην **Εικόνα 3-50** A, B που ακολουθεί απεικονίζονται τα φάσματα EPR των ριζών DMPO-OH $\bullet$ μετά την προσθήκη διαφόρων συγκεντρώσεων GLAM (A) και SiO₂@GLAM (B).



Εικόνα 3-50. Τα φάσματα EPR παρουσιάζουν τη μείωση της συγκέντρωσης των ριζών υδροξυλίου ($\bullet\text{OH}$) στο διάλυμα μετά την εισαγωγή (A) N-Ακετυλ-D-Γλυκοζαμίνης (GLAM) και (B) SiO₂@GLAM. Και στα δύο σχήματα, το φάσμα στην κορυφή παρουσιάζει το αντίστοιχο πείραμα χωρίς την προσθήκη αντιοξειδωτικών.

Οι ποσοτικοί υπολογισμοί καταδεικνύουν μια τάση παρόμοια με εκείνη που παρατηρήθηκε στα υλικά GA και SiO₂@GA, όπου το υβριδικό υλικό εμφανίζει αυξημένη αντιοξειδωτική αποτελεσματικότητα έναντι των ριζών OH σε σύγκριση με την ελεύθερη μορφή του. Ειδικότερα, 1 gr GLAM εμβολιασμένου στην επιφάνεια SiO₂ παρουσιάζει την ικανότητα να εξουδετερώνει 5.7mmol ριζών OH, ενώ η ισοδύναμη ποσότητα ελεύθερης GLAM απομακρύνει 2.7mmol ριζών $\bullet\text{OH}$. Η **Εικόνα 3-51** που ακολουθεί παρουσιάζεται ένα συγκριτικό φάσμα EPR για τα δύο υλικά.

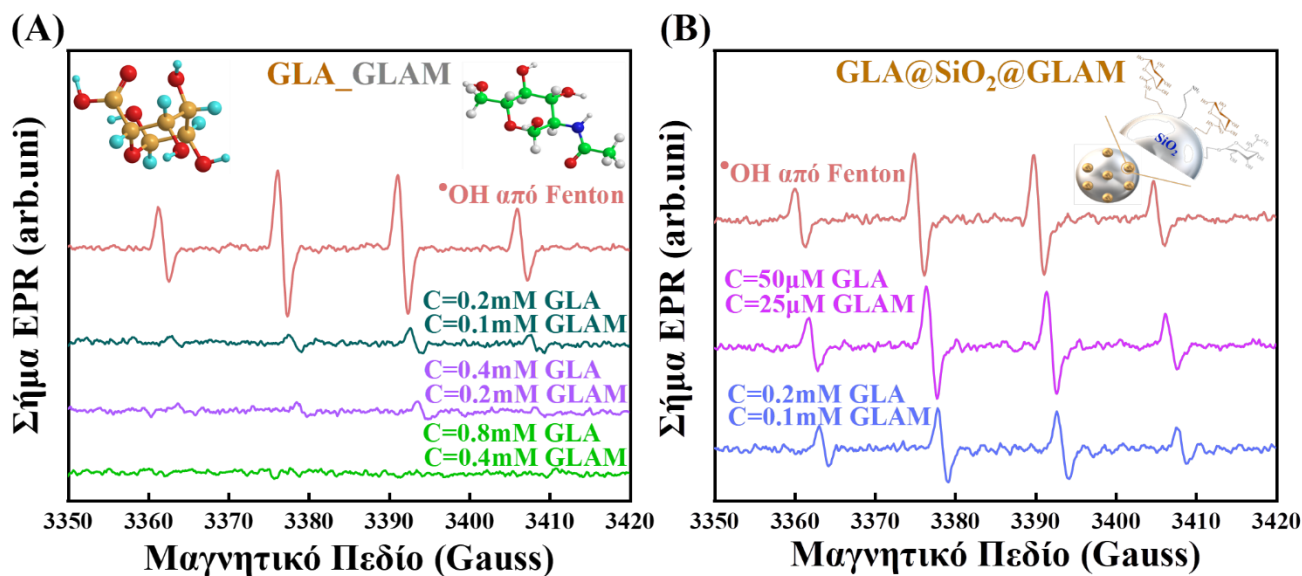


Εικόνα 3-51. Η συγκριτική εξέταση των φασμάτων EPR αποκαλύπτει ότι η Ν-Ακετυλ-D-Γλκοζαμίνη παρουσιάζει μειωμένη αποτελεσματικότητα στη δέσμευση ριζών υδροξυλίου ($\bullet\text{OH}$) σε σύγκριση με το υβριδικό υλικό $\text{SiO}_2@\text{GLAM}$.

3.3.4.4. Αξιολόγηση της ικανότητας εξουδετέρωσης των ριζών OH από το GLA GLAM μετά από απλή ανάμιξή τους και το διπλά εμβολιασμένο υβριδικό υλικό $\text{GLA}@\text{SiO}_2@\text{GLAM}$

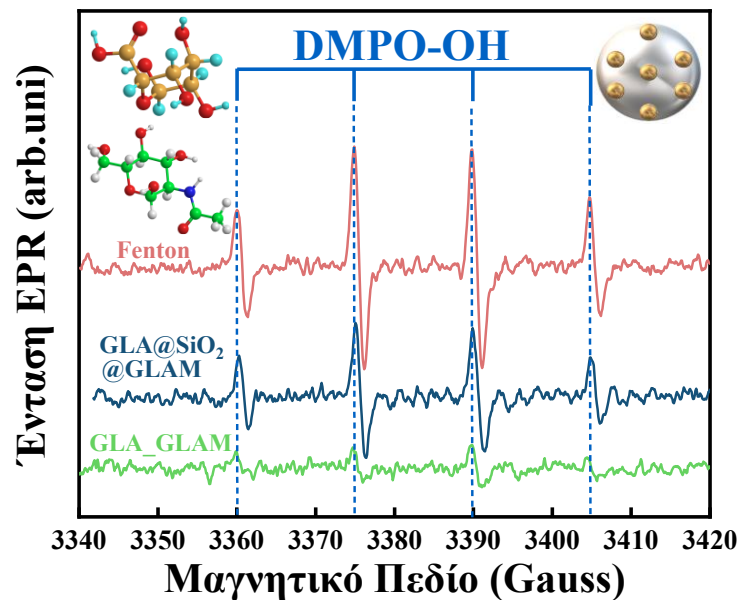
Η αποτελεσματικότητα του μείγματος GLA-GLAM (2:1) που προέκυψε από απλή ανάμιξή τους και του διπλά εμβολιασμένου υβριδικού υλικού $\text{GLA}@\text{SiO}_2@\text{GLAM}$ [GLA:GLAM=(2:1)] έναντι των $\bullet\text{OH}$ αξιολογήθηκε μέσω φασματοσκοπίας EPR, λαμβάνοντας υπόψη ότι το φυσικό υαλουρονικό οξύ περιέχει τα μονομερή GLA : GLAM σε μοριακή αναλογία ίση με 2:1^{284,285}. Αρχικά, το διάλυμα της αντίδρασης Fenton παρασκευάζεται με συνδυασμό $\text{Fe}^{(III)}$ και H_2O_2 , ακολουθούμενο από περίοδο επώασης 30 sec για να εξελιχθεί η αντίδραση. Στη συνέχεια, εισάγονται αμέσως [C=0.2 mM GLA, C=0.1 mM GLAM], [C=0.4 mM GLA, C=0.2 mM GLAM] και [C=0.8 mM GLA, C=0.4 mM GLAM] (**Εικόνα 3-52 A**). Κάθε μεταβολή στις συγκεντρώσεις του μείγματος GLA-GLAM απαιτεί την παρασκευή ενός νέου διαλύματος Fenton. Πανομοιότυπο πειραματικό πρωτόκολλο επαναλήφθηκε για να αξιολογηθεί η αντιοξειδωτική αποτελεσματικότητα του διπλά εμβολιασμένου υβριδικού υλικού $\text{GLA}@\text{SiO}_2@\text{GLAM}$. Ωστόσο,

οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν [C=50μM GLA, C=25μM GLAM] και [C=0.2mM GLA και C=0.1mM GLAM], (Εικόνα 3-52 B).



Εικόνα 3-52. Τα φάσματα EPR αποκαλύπτουν τη μείωση της συγκέντρωσης των ριζών υδροξυλίου ($\bullet\text{OH}$) μετά την εισαγωγή (A) απλού μείγματος GLA-GLAM (2:1) και (B) του διπλά εμβολιασμένου υβριδικού υλικού GLA@SiO₂@GLA. Η κόκκινη γραμμή παρουσιάζει το αντίστοιχο πείραμα χωρίς την προσθήκη αντιοξειδωτικών ειδών.

Η **Εικόνα 3-53** δείχνει ότι η ομοιοπολική σύνδεση των μονομερών υαλουρονικού οξέος, δηλαδή του D-γλουκουρονικού οξέος και της N-ακετυλ-D-γλυκοζαμίνης, στην ίδια επιφάνεια της σίλικα σε μοριακή αναλογία 2:1 έναντι της ικανότητας του απλού μίγματος [GLA- GLAM], οδηγεί σε ελάττωση της εξουδετέρωσης ριζών OH. Πιο συγκεκριμένα 1 gr GLA-GLAM του υλικού απλού μίγματος [GLA-GLAM] (2:1) μπορεί να εξουδετερώσει 4.7 mmol $\bullet\text{OH}$, ενώ 1 gr GLA και GLAM που ακινητοποιούνται στην επιφάνεια της σίλικα μπορούν να εξουδετερώσουν 2.1 mmol $\bullet\text{OH}$. Όπως απεικονίζεται στις **Εικόνα 3-52**, **Εικόνα 3-53**, τα μονομερή GLA-GLAM επιδεικνύουν υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση σε σύγκριση με το διπλά εμβολιασμένο υβριδικό υλικό GLA@SiO₂@GLAM.



Εικόνα 3-53. Απεικονίζεται η σύγκριση φασμάτων EPR του διπλά εμβολιασμένου υβριδικού υλικού GLA@SiO₂@GLAM [GLA-GLAM]=[2:1] ως προς την εξουδετέρωση ριζών υδροξυλίου (•OH) έναντι του αντίστοιχου απλού μίγματος, [GLA-GLAM]=[2:1].

Για να αυξηθεί η ακρίβεια και να ελαχιστοποιηθεί το σφάλμα, κάθε πείραμα διεξήχθη εις τετραπλού για να εξασφαλιστεί η αναπαραγωγικότητα των αποτελεσμάτων.

Συνολικά, ο **Πίνακας 3-3** συνοψίζει τα παρόντα ευρήματα της εξουδετέρωσης των •OH ανά γραμμάριο αντιοξειδωτικής οντότητας. Σύμφωνα με τον (Πίνακας 3-3) η ιεραρχική σειρά της απόδοσης ως προς την εξουδετέρωση των •OH είναι:

$$\{SiO_2@GA\} > GA > GLA > \{SiO_2@GLA\} > \{SiO_2@GLAM\} > \{GLA_GLAM\} > GLAM > \{GLA@SiO_2@GLAM\}$$

Πίνακας 3-3. Ικανότητα απόσβεσης των $\bullet\text{OH}$ (mmol) ανά γραμμάριο αντιοξειδωτικού υλικού.

<i>Αντιοξειδωτικό</i>	<i>Εξουδετέρωση $\bullet\text{OH}$ [mmol ανά γραμμάριο υλικού] (± 0.01)</i>
GA	13.2
SiO₂@GA	16.1
GLA	7.4
SiO₂@GLA	6.2
GLAM	2.7
SiO₂@GLAM	5.7
{GLA_GLAM}* [2:1]	4.7
{GLA@SiO₂@GLAM}* [2:1]	2.1

*Η μοριακή αναλογία [2:1] αναφέρεται σε ακινητοποιημένα μόρια [GLA: GLAM] σε SiO₂ με βάση την ανάλυση TGA.

3.3.5. Συγκριτική μελέτη της ικανότητας των αντιοξειδωτικών να εξουδετερώνουν τόσο τις ρίζες OH και όσο και τις ρίζες DPPH.

Στην μεταπτυχιακή μου διατριβή πραγματοποιήθηκε έρευνα σχετικά με την ικανότητα των υβριδικών υλικών SiO₂@GLA, SiO₂@GLAM και GLA@SiO₂@GLAM^{87,106} στην εξουδετέρωση των ριζών DPPH μέσω του μηχανισμού HAT. Αποδείχθηκε ότι τα υβριδικά υλικά καθώς και τα ελεύθερα μόρια GLA και GLAM παρουσίασαν διαφορετικό προφίλ αντιοξειδωτικής δράσης προς τις ρίζες DPPH. Ο Πίνακας 3-4 παρέχει μια περίληψη της ικανότητας κάθε αντιοξειδωτικού να εξουδετερώνει τόσο τις ρίζες OH όσο και DPPH. Οι παρατηρούμενες αποκλίνοσες αντιοξειδωτικές αποκρίσεις των πιο πάνω αντιοξειδωτικών σχετικά με τις ρίζες OH και DPPH υποδηλώνουν την εμπλοκή διαφορετικών μηχανισμών για την καταπολέμηση κάθε τύπου ρίζας^{286,287}.

Πίνακας 3-4. Ικανότητα εξουδετέρωσης $\bullet\text{OH}$ (mmol) και ικανότητα εξουδετέρωσης DPPH (mmol) ανά γραμμάριο αντιοξειδωτικού.

<i>Αντιοξειδωτικό</i>	<i>Εξουδετέρωση $\bullet\text{OH}$ [mmol ανά γραμμάριο υλικού] (± 0.01)</i>	<i>Εξουδετέρωση DPPH [mmol ανά γραμμάριο υλικού] (± 0.001)</i>	<i>Εξουδετέρωση $\bullet\text{OH}$ (mol OH/mol αντιοξειδωτικού) (± 0.01)</i>	<i>Εξουδετέρωση DPPH μέσω HAT n_{fast} (± 0.2)</i>
GA	13.2	8.8	2.24	1.6
SiO₂@GA	16.1	11.7	2.70	2.0
GLA	7.4	0	1.44	0
SiO₂@GLA	6.2	5.7	1.22	1.1
GLAM	2.7	0	0.6	0
SiO₂@GLAM	5.7	0.9	1.27	0.2
{GLA_GLAM}* [2:1]	4.7	0	1.05	0
{GLA@SiO₂@GLAM}* [2:1]	2.1	5.7	0.57	1.1

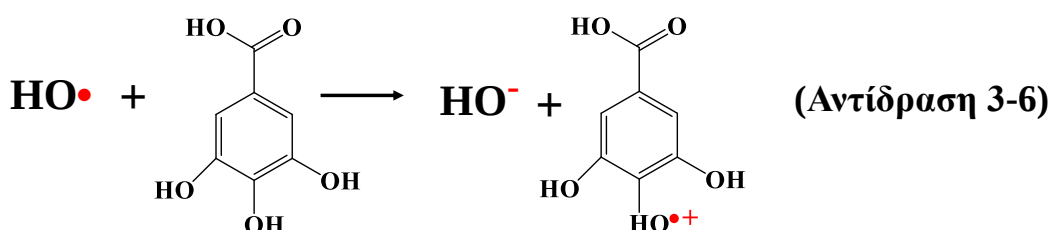
*Η μοριακή αναλογία [2:1] αναφέρεται σε ακινητοποιημένα μόρια [GLA: GLAM] σε SiO₂ με βάση την ανάλυση TGA.

3.3.5.1. Συγκριτική μελέτη των μηχανισμών δράσης του γαλλικού οξέος έναντι των ριζών DPPH και OH

Το γαλλικό οξύ, που είναι μια πολύ γνωστή φαινολική ένωση που υπάρχει παντού στη φύση, καθώς και το υβριδικό υλικό SiO₂@GA, φαίνεται να παρουσιάζουν πολύ υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα τόσο ως προς τις ρίζες DPPH (δηλαδή μέσω HAT) όσο και ως προς τις $\bullet\text{OH}$ σε υδατικό μέσο. Το γαλλικό οξύ (GA) ασκεί την αντιοξειδωτική του δράση κυρίως μέσω δύο μηχανισμών: **Μεταφοράς Ατόμου Υδρογόνου (HAT) και Μεταφοράς Ενός Ηλεκτρονίου (SET)**, μετριάζοντας έτσι το οξειδωτικό στρες και συμβάλλοντας στο ρόλο του ως φυσικό αντιοξειδωτικό^{288,289}. Σε υδατικό διάλυμα, το γαλλικό οξύ εξουδετερώνει τις ρίζες υδροξυλίου ($\bullet\text{OH}$) κυρίως μέσω του μηχανισμού **Μεταφοράς Ενός Ηλεκτρονίου (SET)** και οι ρίζες εξουδετερώνονται μέσω μιας αντίδρασης οξειδοαναγωγής²⁹⁰. Σε αυτή τη διαδικασία, το γαλλικό

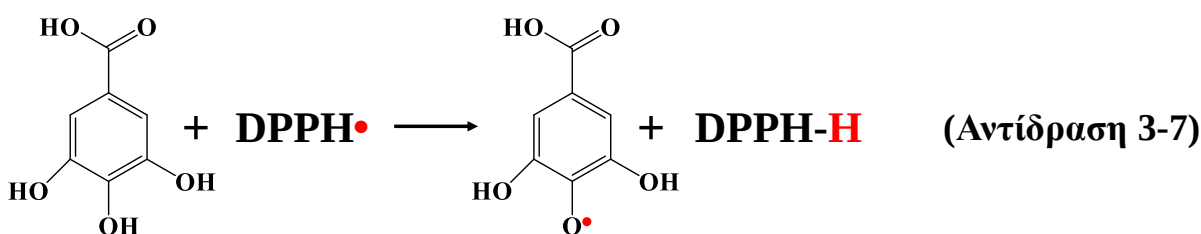
οξύ προσφέρει ένα ηλεκτρόνιο στις ρίζες υδροξυλίου, με αποτέλεσμα να παύουν να υπάρχουν ως ελεύθερες ρίζες, ενώ το γαλλικό οξύ οξειδώνεται προς μια κατιονική ρίζα (GA^{+}) (Αντίδραση 3-6).

Αντιοξειδωτική Ικανότητα έναντι των ριζών OH



Όσον αφορά την εξουδετέρωση των ριζών DPPH σε μη υδατικά μέσα, το γαλλικό οξύ λειτουργεί μέσω μηχανισμού **Μεταφοράς Ατόμου Υδρογόνου (HAT)**, όπως έχει αναλυθεί εκτενώς σε προηγούμενες μελέτες, μέσω των ίδιων θέσεων (Αντίδραση 3-7)¹⁰⁶, εξηγώντας σε κάποιο βαθμό την ανάλογη συμπεριφορά του σε όρους αντιοξειδωτικής δράσης έναντι των ριζών $\bullet OH$ και DPPH.

Αντιοξειδωτική Δράση μέσω μηχανισμού Μεταφοράς-Ατόμου-Υδρογόνου (HAT)

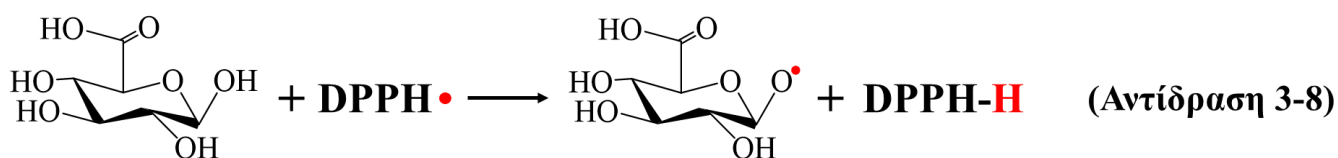


3.3.5.2. Συγκριτική μελέτη των μηχανισμών δράσης του γλουκουρονικού οξέος έναντι των ριζών DPPH και OH

Όσον αφορά το υβριδικό υλικό $SiO_2@GLA$ και το ελεύθερο Γλουκουρονικό οξύ (GLA), φαίνεται ότι και τα δύο παρουσιάζουν υψηλή αντιοξειδωτική δράση έναντι των $\bullet OH$ σε υδατικό διάλυμα, με ελαφρά υπεροχή του γλουκουρονικού οξέος. Είναι ενδιαφέρον ότι το Γλουκουρονικό οξύ παρουσιάζει μηδενική δραστηριότητα προς τις ρίζες DPPH, ενώ το $SiO_2@GLA$ παρουσιάζει

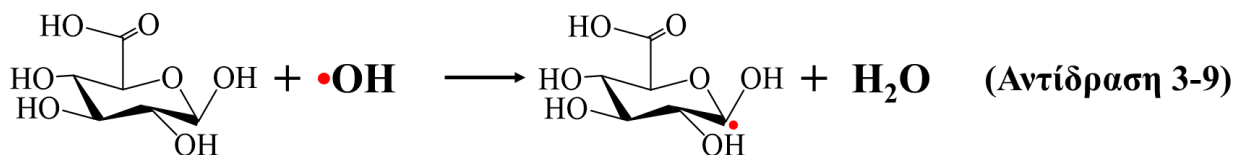
μια αξιοσημείωτη δραστηριότητα, ενεργώντας μέσω μηχανισμού HAT που προσφέρει το άτομο υδρογόνου της ομάδας υδροξυλίου που βρίσκεται κοντά στο άτομο O του σακχάρου (**Αντίδραση 3-8**)^{87,291}. Η ακινητοποίηση του γλουκουρονικού οξέος στην επιφάνεια της σίλικα και ο σχηματισμός του υβριδικού υλικού SiO₂@GLA πραγματοποιείται μέσω της καρβοξυλικής ομάδας του γλουκουρονικού οξέος, μια διεργασία που αυξάνει σημαντικά την αντιοξειδωτική του δράση⁸⁷.

Αντιοξειδωτική Δράση μέσω μηχανισμού Μεταφοράς-Ατόμου-Υδρογόνου (HAT)



Για την εξουδετέρωση των $\bullet\text{OH}$ από το μονοσακχαρίτη D-Γλουκουρονικό οξύ χρησιμοποιείται και πάλι ο μηχανισμός HAT, μέσω του οποίου σχηματίζεται νερό και το Γλουκουρονικό οξύ μετατρέπεται σε ελεύθερη ρίζα (**Αντίδραση 3-9**), με τη συμμετοχή ενός χαλαρά δεσμευμένου ατόμου υδρογόνου του α-άνθρακα που φέρει την ομάδα OH²⁸⁷. Αυτό το OH είναι το ίδιο που προσφέρει το άτομο υδρογόνου για να εξουδετερωθούν οι ρίζες DPPH. Έχει προταθεί ότι σε αερόβια περιβάλλοντα, η ρίζα OH μπορεί να προκαλέσει βλάβη στους πολυσακχαρίτες μέσω μιας ακολουθίας αντιδράσεων, δηλαδή, η ρίζα OH αφαιρεί ένα άτομο υδρογόνου το οποίο βρίσκεται συνδεδεμένο με ένα άτομο άνθρακα και αυτό έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό μιας ρίζας άνθρακα και ενός μορίου νερού (H₂O)²⁸⁶.

Αντιοξειδωτική Ικανότητα έναντι των ριζών OH



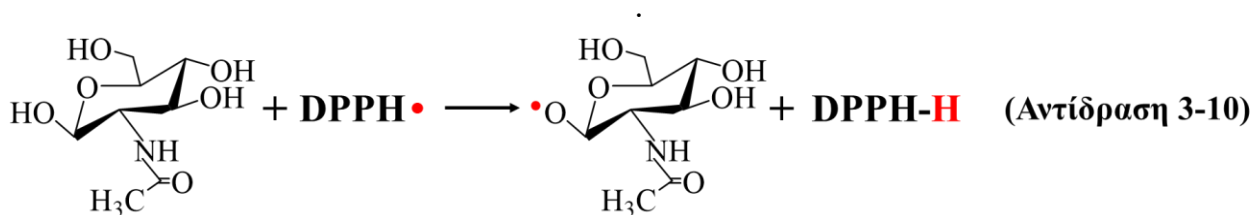
Σε αυτή την περίπτωση, ο εμβολιασμός του γλουκουρονικού οξέος στην επιφάνεια της σίλικα μέσω της καρβοξυλικής ομάδας του φαίνεται να έχει ως αποτέλεσμα μια ελαφρά μείωση της αντιοξειδωτικής δράσης έναντι των ριζών OH, σε σχέση με αυτή του ελεύθερου γλουκουρονικού οξέος. Αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί στην αυξημένη σταθερότητα του

γλουκουρονικού οξέος κατά την ακινητοποίησή του στην επιφάνεια της SiO₂, η οποία αντισυχετίζεται με τον μειωμένο ρυθμό εξουδετέρωσης ριζών υδροξυλίου (•OH) ²⁸⁷. Επιπλέον, προτάθηκε από τους Morelli *et al*, ότι ο μηχανισμός αλληλεπίδρασης με τις ρίζες OH μπορεί να σχετίζεται με την παρουσία σταθερών ενδιάμεσων ελευθέρων ριζών και όχι να αποδίδεται αποκλειστικά στη βλάβη που μπορεί να προκληθεί στο σάκχαρο ²⁸⁷. Δηλαδή, ενώ μπορεί αρχικά να φαίνεται ότι η αντιοξειδωτική δράση του γλουκουρονικού οξέος μειώνεται κατά την ακινητοποίησή του στην επιφάνεια της SiO₂, αυτή η αντίληψη είναι παραπλανητική, αφού ο σχηματισμός του υβριδικού υλικού SiO₂@GLA σταθεροποιεί το GLA, μειώνοντας ελαφρώς την δραστηριότητά του έναντι των •OH.

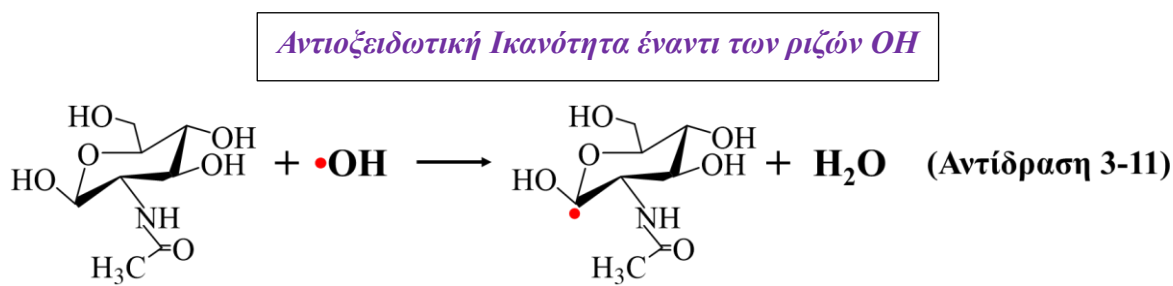
3.3.5.3. Συγκριτική μελέτη των μηχανισμών δράσης της γλυκοζαμίνης έναντι των ριζών DPPH και OH

Σε ότι αφορά την αντιοξειδωτική δράση του υβριδικού υλικού SiO₂@GLAM, υπάρχει σημαντική διαφορά ανάμεσα στην ικανότητα εξουδετέρωσης των ριζών DPPH και OH. Κατά τη διάρκεια της εξουδετέρωσης των ριζών DPPH μέσω του μηχανισμού HAT, το άτομο υδρογόνου της ομάδας υδροξυλίου που βρίσκεται κοντά στο άτομο O του σακχάρου (**Αντίδραση 3-10**) αναμένεται να εμπλέκεται στην αντίδραση ^{291,292}. Ωστόσο, αυτή η θέση, όντας η πιο όξινη, έχει ήδη αντιδράσει κατά τη διαδικασία εμβολιασμού της Ν-Ακετυλ-D-Γλυκοζαμίνης στην επιφάνεια της σίλικα ⁸⁷. Έτσι, καθώς αυτό το άτομο υδρογόνου δεν είναι πλέον διαθέσιμο, το υβριδικό υλικό SiO₂@GLAM εμφανίζει πολύ χαμηλή αντιοξειδωτική δράση έναντι των ριζών DPPH. Το μονομερές της γλυκοζαμίνης εμφανίζει ανάλογη συμπεριφορά με αυτή του γλουκουρονικού οξέος έναντι των ριζών DPPH (μηδενική δραστηριότητα).

Αντιοξειδωτική Δράση μέσω μηχανισμού Μεταφοράς-Ατόμου-Υδρογόνου (HAT)



Κατά συνέπεια, το μονομερές GLAM και το υβριδικό υλικό SiO₂@GLAM που ταξινομούνται ως σάκχαρα, ασκούν την αντιοξειδωτική τους δράση έναντι των $\bullet\text{OH}$ κυρίως μέσω μηχανισμού HAT, όπου το αφαιρούμενο άτομο υδρογόνου προέρχεται από τον α -άνθρακα με αποτέλεσμα την παραγωγή ενός μορίου H₂O (**Αντίδραση 3-11**). Σε αυτή τη διεργασία, το ίδιο το GLAM μετατρέπεται σε ρίζα.



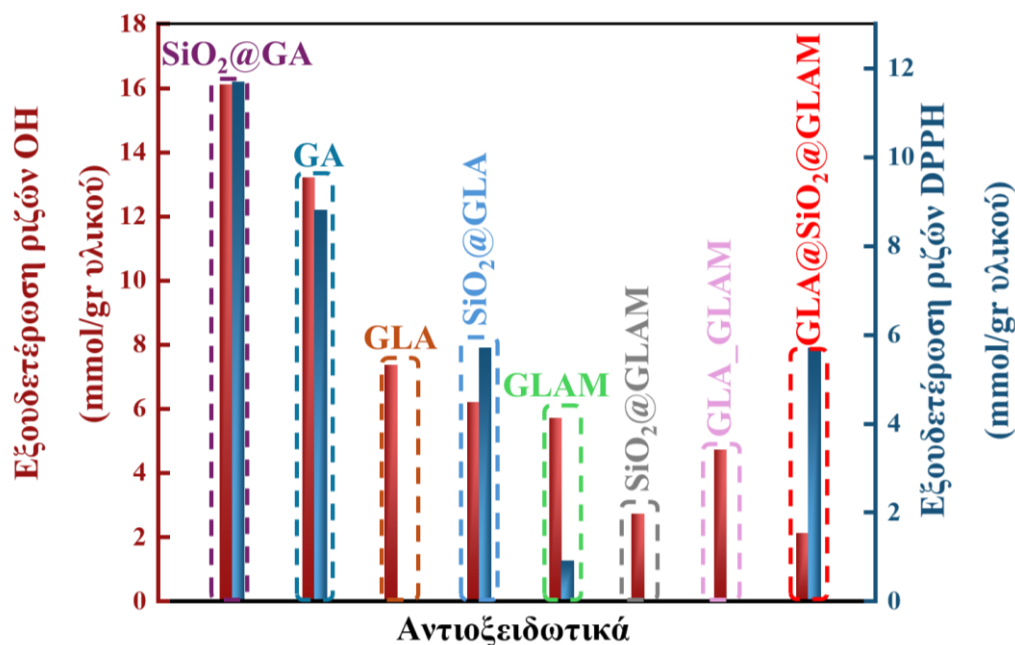
Το υβριδικό υλικό SiO₂@GLAM διαθέτει το άτομο υδρογόνου του α -άνθρακα ώστε να μπορεί να αντιδράσει με ρίζες OH, επομένως ο μηχανισμός HAT λειτουργεί χωρίς καμία παρεμπόδιση σε αντίθεση με τον μηχανισμό HAT έναντι των ριζών DPPH. Επιπλέον, το υβριδικό υλικό SiO₂@GLAM παρουσιάζει μεγαλύτερη ικανότητα εξουδετέρωσης των ριζών OH σε σύγκριση με το ελεύθερο μονομερές της γλυκοζαμίνης λόγω της ικανότητας του υβριδικού υλικού να αναγεννάται μέσω της απόκτησης ατόμων υδρογόνου από τον περιβάλλοντα διαλύτη, συνήθως το νερό. Ως αποτέλεσμα, το υβριδικό υλικό επιδεικνύει ενισχυμένη σταθερότητα και πιο αποτελεσματική απόσβεση των $\bullet\text{OH}$ ²⁸⁷.

Από τα δεδομένα του EPR και την προηγούμενη συζήτηση, διαφαίνεται ότι η συν-ακινητοποίηση των μονομερών του υαλουρονικού οξέος D-Γλυκουρονικό οξύ (GLA) και N-Ακετυλ-D-Γλυκοζαμίνη (GLAM) στην ίδια επιφάνεια σίλικα ενισχύει σημαντικά τη σταθερότητα του υλικού έναντι των ελεύθερων ριζών. Κατά συνέπεια, η μείωση στα σήματα EPR των $\bullet\text{OH}$ είναι λιγότερο έντονη. Σε αυτό το πλαίσιο, θεωρήθηκε ότι τα υλικά εξουδετερώνουν τις ρίζες υδροξυλίου ($\bullet\text{OH}$) μέσω μηχανισμού **Μεταφοράς Ατόμου Υδρογόνου (HAT)**, που περιλαμβάνει την μεταφορά ενός ατόμου υδρογόνου από ένα άτομο άνθρακα (**Αντίδραση 3-9, Αντίδραση 3-11**). Το διπλά εμβολιασμένο υβριδικό υλικό GLA@SiO₂@GLAM, λόγω του ότι αποτελείται από δύο μόρια GLA και ένα μόριο GLAM, παρουσιάζει ιδιότητες παρόμοιες με εκείνες του υβριδικού υλικού SiO₂@GLA παρά του υβριδικού υλικού SiO₂@GLAM. Ωστόσο, με βάση τα σήματα EPR, η αντιοξειδωτική δράση του υβριδικού υλικού GLA@SiO₂@GLAM φαίνεται να είναι

χαμηλότερη σε σύγκριση με εκείνη των απλά εμβολιασμένων υβριδικών υλικών $\text{SiO}_2@\text{GLA}$ και $\text{SiO}_2@\text{GLAM}$, πιθανώς λόγω στερικών παρεμποδίσεων που προκαλούνται από το υψηλό οργανικό φορτίο των GLA και GLAM στην επιφάνεια της σίλικα. Αυτό δεν ισχύει για το $\text{GLA}@\text{SiO}_2@\text{GLAM}$ σε ότι αφορά την εξουδετέρωση των ριζών DPPH, όπου χρησιμοποιούνται τα πιο εκτεθειμένα άτομα υδρογόνου των ομάδων OH έναντι του σκελετικού CH.

Τέλος, με βάση τα δεδομένα του **Πίνακα 3-4** και της **Εικόνα 3-54**, το υβριδικό υλικό $\text{SiO}_2@\text{GA}$ παρουσιάζει την υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση από όλα τα υλικά, ακόμη και από εκείνη του ελεύθερου γαλλικού οξέος, υπογραμμίζοντας την ευεργετική επίδραση του ακινητοποιημένου γαλλικού οξέος στην αντιοξειδωτική του δραστηριότητα. Το γαλλικό οξύ και το υβριδικό υλικό $\text{SiO}_2@\text{GA}$ εξουδετερώνουν τις $\bullet\text{OH}$ μέσω μηχανισμού **Μεταφοράς Ενός Ηλεκτρονίου (SET)**, όπου ένα ηλεκτρόνιο αποσπάται από μια ομάδα υδροξυλίου του γαλλικού οξέος. Αντίθετα, τα υβριδικά υλικά, $\text{SiO}_2@\text{GLA}$ και $\text{GLA}@\text{SiO}_2@\text{GLAM}$ επιδεικνύουν μειωμένη ικανότητα δέσμευσης ριζών OH, παρά την αυξημένη σταθερότητά τους, σε σύγκριση με τα αντίστοιχα μονομερή τους.

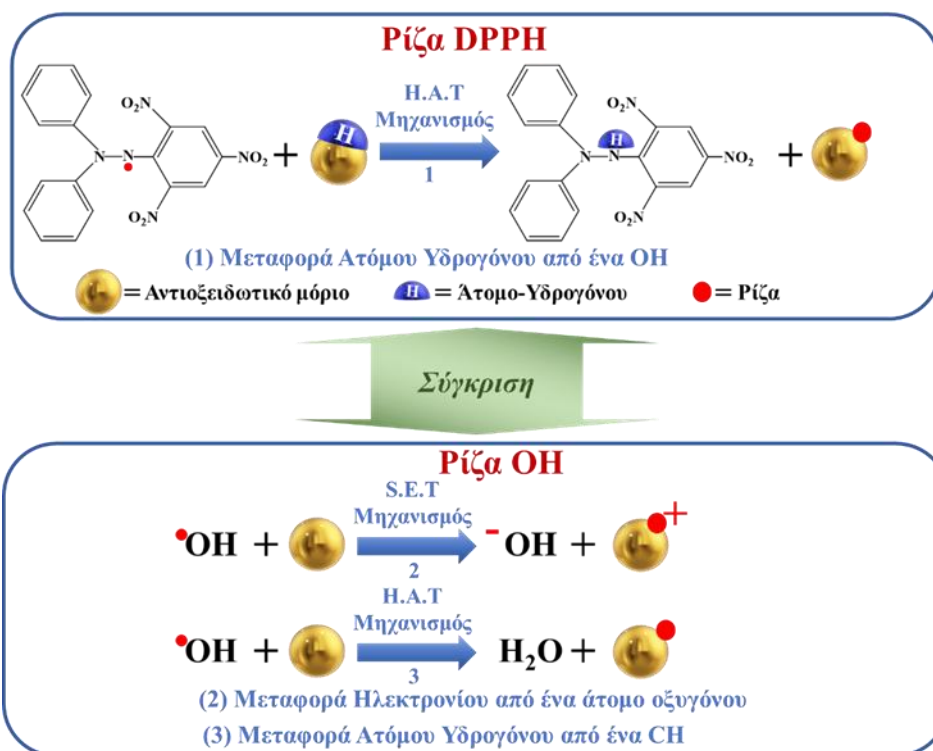
Το μοναδικό υβριδικό υλικό που εμφανίζει συμπεριφορά ανάλογη με εκείνη του υβριδικού υλικού $\text{SiO}_2@\text{GA}$ είναι το $\text{SiO}_2@\text{GLAM}$, όπου παρουσιάζει ενισχυμένη αντιοξειδωτική δράση σε σύγκριση με το ελεύθερο μονομερές GLAM. Αυτό αποδίδεται στην ικανότητα του υβριδικού υλικού $\text{SiO}_2@\text{GLAM}$ να αναγεννάται αποσπώντας ένα άτομο υδρογόνου από το νερό. Γενικά, τα ελεύθερα μόρια του γλουκουρονικού οξέος (GLA), της γλυκοζαμίνης (GLAM) και το απλό μίγμα GLA-GLAM εμφανίζουν αμελητέα αντιοξειδωτική δράση έναντι των ριζών DPPH. Ωστόσο, όσον αφορά τις ρίζες OH, παρουσιάζουν αξιοσημείωτα υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα. Από την άλλη πλευρά, τα υβριδικά υλικά επιδεικνύουν σημαντικά μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα στην εξουδετέρωση ριζών DPPH σε σύγκριση με την ικανότητά τους να δεσμεύουν ρίζες OH (**Εικόνα 3-54**).



Εικόνα 3-54. Η ικανότητα δέσμευσης ριζών υδροξυλίου ($\bullet\text{OH}$) και DPPH, εκφρασμένη σε mmol ανά γραμμάριο κάθε αντιοξειδωτικού.

Το πιο αξιοσημείωτο εύρημα μεταξύ των προαναφερθεισών παρατηρήσεων είναι η σημαντική αλλαγή στη συμπεριφορά του διπλά εμβολιασμένου υβριδικού υλικού GLA@SiO₂@GLAM, ιδιαίτερα όσον αφορά την ικανότητά του να εξουδετερώνει τις ρίζες DPPH και OH. Το διπλά εμβολιασμένο υβριδικό υλικό GLA@SiO₂@GLAM επιδεικνύει μεγαλύτερη ικανότητα δέσμευσης ριζών DPPH σε σύγκριση με τα απλά εμβολιασμένα υβριδικά υλικά SiO₂@GLA και SiO₂@GLAM. Αυτό υποδηλώνει ότι όταν και τα δύο μονομερή του υαλουρονικού οξέος ακινητοποιούνται στην ίδια επιφάνεια της σίλικα, δρουν συνεργιστικά και μέσω μηχανισμού **Μεταφοράς Ατόμου Υδρογόνου (HAT)**, εξουδετερώνουν αποτελεσματικά τις ρίζες DPPH με συμμετοχή του **ατόμου υδρογόνου** της ομάδας υδροξυλίου του γλουκουρονικού οξέος που βρίσκεται κοντά στο **άτομο Ο του σακχάρου**. Το διπλά εμβολιασμένο υβριδικό υλικό GLA@SiO₂@GLAM παρουσιάζει σημαντικά χαμηλότερη αντιοξειδωτική δράση έναντι των ριζών υδροξυλίου ($\bullet\text{OH}$) σε σύγκριση με τις ρίζες DPPH. Δεδομένου ότι ο υιοθετούμενος μηχανισμός για την απόσβεση των $\bullet\text{OH}$ είναι πιθανώς **HAT** μέσω μεταφοράς **ατόμου υδρογόνου από τον C-H**, η παρατηρούμενη χαμηλή αντιοξειδωτική δράση αποδίδεται σε στερικούς λόγους κυρίως λόγω του υψηλού οργανικού φορτίου των μονομερών GLA και GLAM στην επιφάνεια της SiO₂ με αποτέλεσμα την περιορισμένη προσβασιμότητα σε άτομα C-H (**Εικόνα 3-55**).

Συνολικά, τα αντιοξειδωτικά με βάση το γαλλικό οξύ λειτουργούν μέσω του μηχανισμού **Μεταφοράς Ενός Ηλεκτρονίου (SET)** έναντι των $\bullet\text{OH}$ και μέσω του μηχανισμού **Μεταφοράς Ατόμου Υδρογόνου (HAT)** έναντι των ριζών DPPH από το ίδιο άτομο **O** μιας ομάδας **OH**. Από την άλλη πλευρά, τα αντιοξειδωτικά με βάση τα σάκχαρα, D- Γλυκουρονικό οξύ (GLA) και N-Ακετυλ- D-Γλυκοζαμίνη (GLAM), χρησιμοποιούν μηχανισμό **Μεταφοράς Ατόμου Υδρογόνου (HAT)** ενάντια στις ρίζες υδροξυλίου ($\bullet\text{OH}$) και στις DPPH με τη συμμετοχή ενός ατόμου υδρογόνου γειτονικών ομάδων **C-H** και **O-H** αντίστοιχα. Λαμβάνοντας υπόψη αυτές τις μηχανιστικές εκτιμήσεις, η διαδικασία εμβολιασμού θέτει περιορισμούς όπως στερεοχημική παρεμπόδιση ή αποκλεισμό συγκεκριμένων θέσεων παρά τη σταθερότητα που προσφέρει και έτσι εξηγούνται οι παρατηρούμενες αλλαγές στην αντιοξειδωτική δράση έναντι των ριζών OH και DPPH των υπό μελέτη αντιοξειδωτικών υλικών (**Εικόνα 3-55**).



Εικόνα 3-55. Σχηματική αναπαράσταση των τριών πιθανών μηχανισμών δράσης ενός αντιοξειδωτικού. Στην περίπτωση της σταθερής ρίζας (DPPH), μπορεί να λειτουργήσει η μεταφορά ενός ατόμου υδρογόνου από ένα OH. Στην περίπτωση των ευκίνητων ριζών OH, επικρατεί ο μηχανισμός μεταφοράς ενός ηλεκτρονίου και ο μηχανισμός HAT μπορεί να λειτουργήσει με την αφαίρεση ενός ατόμου υδρογόνου από ένα CH.

3.3.6. Συμπεράσματα

Με τη χρήση EPR μελετήσαμε την αποτελεσματικότητα εξουδετέρωσης ριζών OH από τα υβριδικά υλικά $\text{SiO}_2@\text{GA}$, $\text{SiO}_2@\text{GLA}$, $\text{SiO}_2@\text{GLAM}$ και του διπλά εμβολιασμένου $\text{GLA}@\text{SiO}_2@\text{GLAM}$ με μοριακή αναλογία $[\text{GLA}:\text{GLAM}]$ [2:1]. Τα δεδομένα αποκάλυψαν ότι το πιο αποτελεσματικό από όλα τα υβριδικά υλικά είναι το **$\text{SiO}_2@\text{GA}$** , το οποίο μπορεί να εξουδετερώσει **2.7 moles ριζών υδροξυλίου (OH) ανά mole ακινητοποιημένου GA**. Επιπλέον, διεξήχθη για πρώτη φορά συγκριτική ανάλυση της ικανότητας αυτών των υλικών ως προς την εξουδετέρωση τόσο των ριζών **DPPH** όσο και των ριζών υδροξυλίου (**$\bullet\text{OH}$**). Η μελέτη έδειξε ότι τα υβριδικά υλικά χρησιμοποιούν διαφορετικούς μηχανισμούς για να αλληλεπιδρούν με αυτούς τους δύο τύπους ριζών. Για τις ρίζες υδροξυλίου (**$\bullet\text{OH}$**), οι μηχανισμοί που εμπλέκονται είναι η **Απλή Μεταφορά Ηλεκτρονίου (SET)** και η **Μεταφορά Ατόμου Υδρογόνου (HAT)** από ένα **CH δεσμό**. Αντίθετα, για τις ρίζες DPPH, ο μηχανισμός **Μεταφοράς Ατόμου Υδρογόνου (HAT)** περιλαμβάνει αφαίρεση ατόμου υδρογόνου από **ομάδες OH**. Επιπλέον, στο διπλά εμβολιασμένο υβριδικό υλικό $\text{GLA}@\text{SiO}_2@\text{GLAM}$, τα δύο μονομερή λειτουργούν συνεργιστικά ενισχύοντας την αντιοξειδωτική ικανότητα έναντι των ριζών DPPH, αλλά όχι την ικανότητα εξουδετέρωσης των **$\bullet\text{OH}$** . Η ικανότητα του υβριδικού υλικού να εξουδετερώνει τις **$\bullet\text{OH}$** μειώνεται λόγω της στερεοχημικής παρεμπόδισης που προκαλείται από την πυκνή παρουσία μορίων GLA και GLAM που επηρεάζει την προσβασιμότητα στους σκελετικούς δεσμούς CH.

3.4. Μελέτη της αλληλεπίδρασης των υβριδικών υλικών SFd@GA, SFd@GLA, SFd@GLAM και GLA@SFd@GLAM, με τις ρίζες OH, καθώς και συγκριτική μελέτη σε σχέση με την αντιοξειδωτική τους δράση έναντι των ριζών DPPH.

3.4.1. Εισαγωγή

Στο προηγούμενο κεφάλαιο δείξαμε ότι τα υβριδικά υλικά με μήτρα ίνες μεταξιού, SFd@GLA, SFd@GLAM, GLA@SFd@GLAM και το SFd@GA εμφανίζουν πολύ καλή αντιοξειδωτική δράση έναντι των ριζών DPPH. Επίσης αυτά τα υλικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν ξανά και ξανά χωρίς να μειώνεται η αντιοξειδωτική τους δράση. Στο υποκεφάλαιο 3.3.1. δείξαμε ότι τα υβριδικά υλικά που έχουν ως υλικό υποστήριξης τη σίλικα δρουν ως κλασσικά αντιοξειδωτικά και θυσιάζόμενα τα ίδια, αλληλεπιδρούν με τις ρίζες OH και τις εξουδετερώνουν.

Με βάση τα πιο πάνω αποτελέσματα θέλαμε να δούμε αν τα υβριδικά υλικά με υλικό υποστήριξης το αποκομμιωμένο μετάξι (SFd), αλληλεπιδρούν με ρίζες OH και τον πιθανό τρόπο αλληλεπίδρασής τους. Επιπλέον εξετάσαμε αν μετά την αλληλεπίδρασή τους με τις ρίζες OH μπορούν να ξαναχρησιμοποιηθούν.

3.4.2. Αλληλεπίδραση των τροποποιημένων μεταξωτών ινών με ρίζες υδροξυλίου ($\bullet$ OH)

Η διερεύνηση της αλληλεπίδρασης των υβριδικών υλικών με μήτρα ίνες μεταξιού έναντι των ριζών υδροξυλίου ($\bullet$ OH) διεξήχθη και παρακολουθήθηκε με φασματοσκοπία EPR. Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε για την δημιουργία των ριζών OH και την επακόλουθη αλληλεπίδρασή τους με τα υβριδικά υλικά αναλύθηκε λεπτομερώς στην προηγούμενη ενότητα. Εν συντομία, το διάλυμα που περιέχει ρίζες DMPO-OH εμφανίζει ένα διακριτό φάσμα EPR που χαρακτηρίζεται από τετραπλέτα κορυφών με ένταση 1:2:2:1^{280,293–295}. Κατά την εισαγωγή των αντιοξειδωτικών μορίων στο διάλυμα της Fenton, το τετραπλό σήμα EPR αναμένεται να μειωθεί ως αποτέλεσμα της απόσβεσης των $\bullet$ OH.

Για την μελέτη της δραστηριότητας των υλικών SF, SFd, και των υβριδικών υλικών SFd@GLA, SFd@GLAM, GLA@SFd@GLAM, SFd@GA το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε ήταν το εξής: αρχικά παρασκευάστηκε η αντίδραση Fenton όπως περιεγράφηκε προηγουμένως. Το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και ο σίδηρος (Fe) αφέθηκαν να αντιδράσουν για 30 sec πριν από την εισαγωγή των ινών. Μετά την παρέλευση 30 sec, εισήχθησαν περίπου 6 mg από κάθε δείγμα και αφέθηκαν άλλα 30 sec να αλληλεπιδράσουν με τα αντιδραστήρια Fenton. Στη συνέχεια, εισήχθη στο διάλυμα DMPO 6.67 mM. Η προσθήκη αυτή αποσκοπεί στην παράταση του χρόνου ημιζωής των ριζών υδροξυλίου ($\bullet\text{OH}$). Όμοια, ένας ακριβής όγκος 20 μL από το παρασκευασμένο εναιώρημα μεταφέρθηκε σε γυάλινους τριχοειδή σωλήνες που τοποθετήθηκαν στη συνέχεια στην κοιλότητα EPR μέτρηση (Εικόνα 3-56).

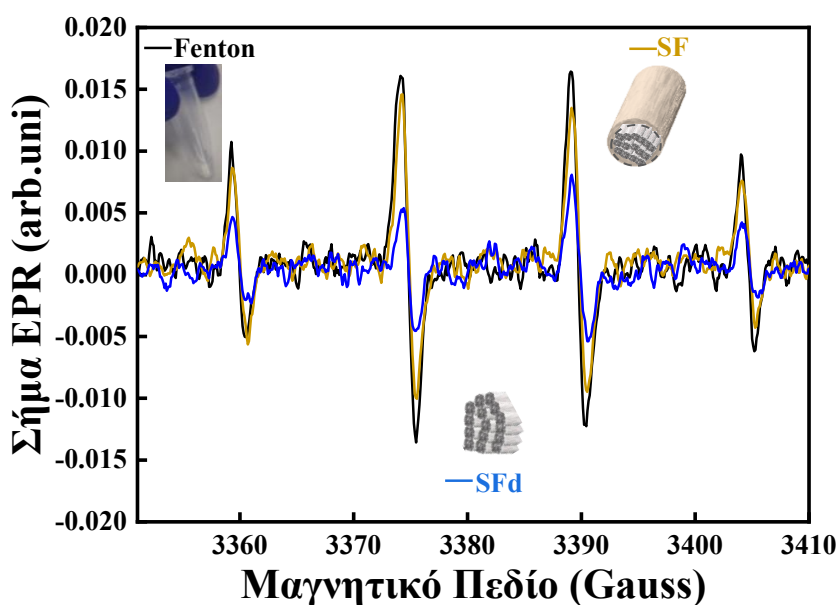


Εικόνα 3-56. Χρονική εξέλιξη της αντίδρασης Fenton παρουσία υβριδικών υλικών με βάση ίνες μεταξιού.

3.4.2.1. Αλληλεπίδραση φυσικού μεταξίου (SF) και αποκομμωμένου μεταξίου (SFd) με ρίζες OH

Στην παρακάτω εικόνα (**Εικόνα 3-57**) φαίνονται τα φάσματα EPR των ριζών OH παρουσία των υλικών SF και SFd. Διακρίνουμε μια πάρα πολύ μικρή μείωση της έντασης του σήματος των ριζών OH στο EPR, γεγονός που υποδεικνύει ότι το φυσικό μετάξι αλληλεπιδρά ελάχιστα με τις ρίζες OH. Σκεπτόμενοι την αντίσταση του φυσικού μεταξίου έναντι οξειδωτικών βλαβών, η απροθυμία του SF να αντιδράσει με $\bullet\text{OH}$ θα μπορούσε να αποδοθεί σε μια επιφανειακή προστατευτική ασπίδα του μεταξίου έναντι των βλαβερών επιπτώσεων των ριζών OH. Η σερίκίνη μπορεί να αντιπροσωπεύει αυτή την ασπίδα παρέχοντας προστασία στο μετάξι και αναστέλλοντας έτσι την δραστηριότητα των $\bullet\text{OH}$ με αυτό.

Κατά την απομάκρυνση της σερίκνης από το μετάξι, οδηγούμαστε στο αποκομμωμένο μετάξι (SFd), όπου η ικανότητα αλληλεπίδρασης και εξουδετέρωσης των ριζών υδροξυλίου ($\bullet\text{OH}$) αυξάνεται σημαντικά (**Εικόνα 3-57**), καθώς η προστατευτική δράση της σερίκνης μειώνεται. Αυτό δείχνει ότι η σερίκίνη δρα ως προστατευτικό φράγμα έναντι των ριζών υδροξυλίου για το φυσικό μετάξι.

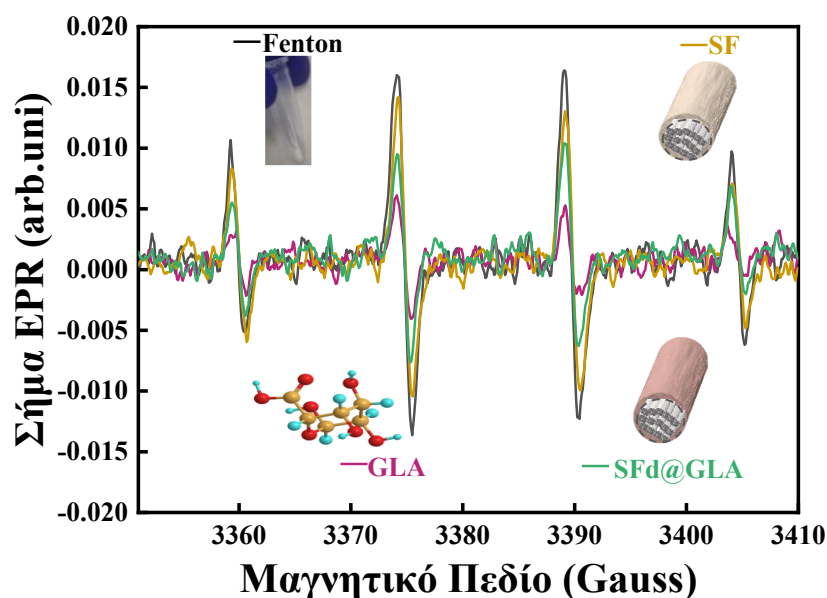


Εικόνα 3-57. Φάσματα EPR της αντίδρασης Fenton, παρουσία φυσικού μεταξίου (SF) και αποκομμωμένου μεταξίου (SFd), τα τελευταία παρουσιάζουν μείωση της συγκέντρωσης των ριζών υδροξυλίου ($\bullet\text{OH}$) υποδεικνύοντας μειωμένη προστατευτική δράση έναντι των ριζών OH.

Υπολογίσθηκε ότι 1gr SFd μπορεί να εξουδετερώσει 0.98 $\mu\text{mol } \bullet\text{OH}$, ενώ 1 gr SF μπορεί να εξουδετερώσει μόλις 0.21 $\mu\text{mol } \bullet\text{OH}$.

3.4.2.2. Αλληλεπίδραση του υβριδικού υλικού SFd@GLA με ρίζες OH

Στην παρακάτω εικόνα (**Εικόνα 3-58**) φαίνονται τα φάσματα EPR των ριζών OH παρουσία των SF, GLA, και του υβριδικού υλικού SFd@GLA. Το ελεύθερο μόριο του D-Γλουκουρονικού οξέος, αντιδρά με τις ρίζες και τις εξουδετερώνει σε πολύ μεγάλο βαθμό, αφού δεν παρουσιάζει καμία αυτοπροστασία. Από την άλλη όταν το μονομερές του GLA εμβολιαστεί στην επιφάνεια του αποκομμιωμένου μεταξιού, δημιουργείται και πάλι ένα προστατευτικό πλέγμα στο μεταξωτό ύφασμα και έτσι δεν επιτρέπεται στις ρίζες OH να επιτεθούν στο υλικό. Η αυτοπροστασία του υβριδικού υλικού SFd@GLA, είναι μικρότερη από αυτή του φυσικού μεταξιού, δηλαδή από την αυτοπροστασία που παρέχει η σερικίνη.

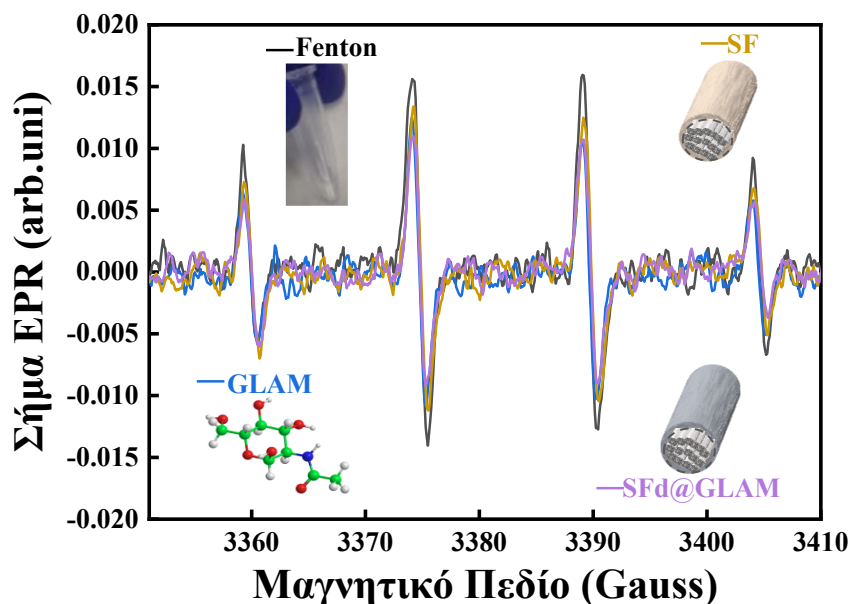


Εικόνα 3-58. Φάσματα EPR της αντίδρασης Fenton, παρουσία ακατέργαστου μεταξιού (SF), το ελεύθερου γλουκουρονικού οξέος και υβριδικού υλικού SFd@GLA.

Από υπολογισμούς που 1gr GLA μπορεί να εξουδετερώσει 7300 $\mu\text{mol } \bullet\text{OH}$, ενώ 1 gr SF@GLA μπορεί να εξουδετερώσει 0.8 $\mu\text{mol } \bullet\text{OH}$.

3.4.2.3. Αλληλεπίδραση του υβριδικού υλικού SFd@GLAM με ρίζες OH

Η **Εικόνα 3-59** απεικονίζει τα φάσματα EPR των ριζών OH παρουσία του SF, του GLAM και του υβριδικού υλικού SFd@GLAM. Το ελεύθερο μόριο της Ν-Ακετυλ-D-Γλυκοζαμίνης επιδεικνύει σημαντική ικανότητα εξουδετέρωσης των ριζών OH, γεγονός που αποδίδεται στην απουσία εγγενών προστατευτικών μηχανισμών εντός του μορίου. Αντίθετα, όταν το μονομερές GLAM εμβολιάζεται στην επιφάνεια της αποκομιωμένης μεταξωτής μήτρας, σχηματίζεται ένα προστατευτικό πλέγμα εντός της δομής του υβριδικού υλικού. Αυτό το πλέγμα αναστέλλει τη διείδυση και την επίθεση των ριζών υδροξυλίου ($\bullet\text{OH}$). Ωστόσο, οι ιδιότητες αυτοπροστασίας του υβριδικού υλικού SFd@GLAM είναι μειωμένες σε σύγκριση με εκείνες του φυσικού μεταξιού (**Εικόνα 3-59**) που φέρει τη σερίκίνη, η οποία συμβάλλει εγγενώς στην αυτοπροστασία του.

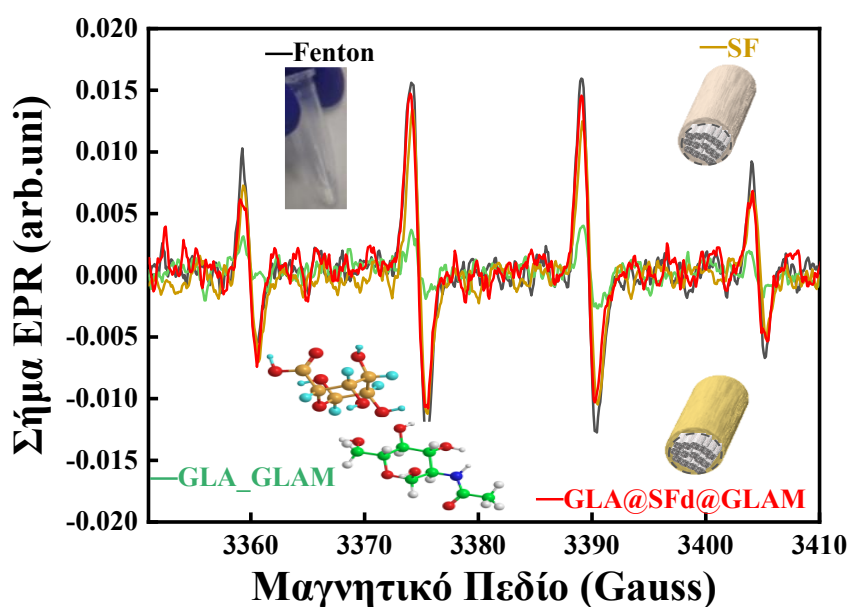


Εικόνα 3-59. Φάσματα EPR της αντίδρασης Fenton παρουσία ακατέργαστου μεταξιού (SF), ελεύθερης γλυκοζαμίνης και το υβριδικού υλικού SFd@GLAM.

Υπολογίσθηκε ότι 1gr GLAM μπορεί να εξουδετερώσει 2700 μmol $\bullet\text{OH}$, ενώ 1 gr SF@GLAM μπορεί να εξουδετερώσει 0.6 μmol $\bullet\text{OH}$.

3.4.2.4. Αλληλεπίδραση του διπλά εμβολιασμένου υβριδικού υλικού GLA@SFd@GLAM με ρίζες OH

Στην **Εικόνα 3-60** παρουσιάζονται τα φάσματα EPR των ριζών OH παρουσία του SF, του απλού μίγματος GLA_GLAM και του διπλά εμβολιασμένου υβριδικού υλικού GLA@SFd@GLA. Το υλικό της απλής ανάμιξης GLA_GLAM παρουσιάζει έντονη ικανότητα εξουδετέρωσης των ελεύθερων ριζών, συμπεριφορά που αποδίδεται στην έλλειψη εγγενών προστατευτικών δομών. Αντίθετα, όταν αμφότερα τα μονομερή του υαλουρονικού οξέος GLA και GLAM ακινητοποιούνται στο ίδιο ύφασμα SFd, με αποτέλεσμα τη δημιουργία του διπλά εμβολιασμένου υβριδικού υλικού GLA@SFd@GLAM όπου [GLA:GLAM]=[2:1], η προστατευτική ικανότητα του SFd ενισχύεται σε βαθμό ισοδύναμο ή ακόμη και σε βαθμό που ξεπερνά την αρχική προστασία που του παρέχει η σερικήνη (**Εικόνα 3-60**). Αυτή η συμπεριφορά θα μπορούσε να οφείλεται σε συνεργιστική δράση των δύο μονομερών στην κοινή μήτρα, με αποτέλεσμα την ενισχυμένη προστασία.

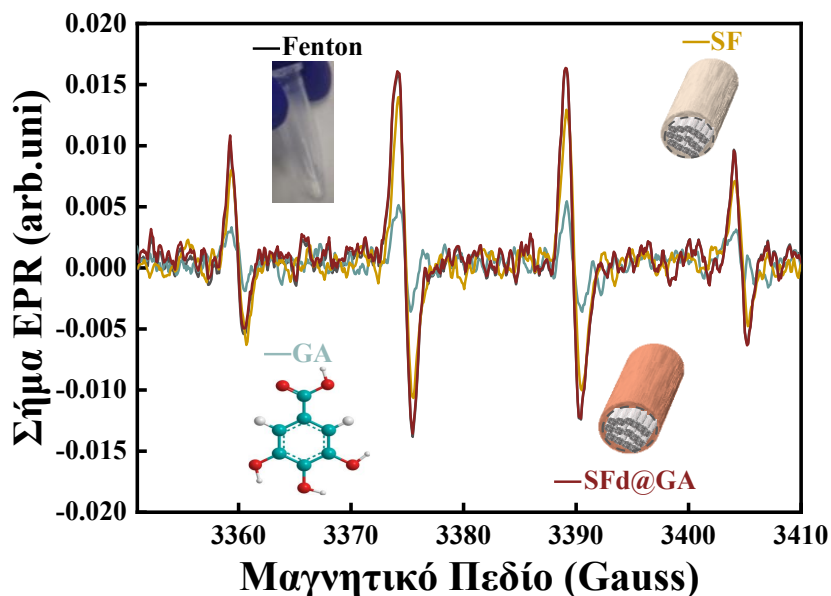


Εικόνα 3-60. Φάσματα EPR της αντίδρασης Fenton παρουσία ακατέργαστου μεταξιού (SF), μίγματος GLA_GLAM, και διπλά εμβολιασμένου υβριδικού υλικού GLA@SFd@GLAM.

Μέσω υπολογισμών που πραγματοποιήθηκαν, 1gr GLAM_GLAM μπορεί να εξουδετερώσει 4700 μmol $\bullet\text{OH}$, ενώ 1 gr GLA@SF@GLAM μπορεί να εξουδετερώσει 0.2 μmol $\bullet\text{OH}$.

3.4.2.5. Αλληλεπίδραση του υβριδικού υλικού SFd@GA με ρίζες OH

Για λόγους πληρότητας, εδώ αξιολογήσαμε την ανθεκτικότητα του υβριδικού υλικού {SFd@Gallic Acid}, έναντι των ριζών υδροξυλίου. Η υπόθεση εργασίας ήταν ότι το {SFd@εμβολιασμένο αντιοξειδωτικό} θα παρουσίαζε {ενισχυμένη ανθεκτικότητα/χαμηλότερη αντιδραστικότητα} έναντι των $\bullet\text{OH}$. Πράγματι, τα δεδομένα στην **Εικόνα 3-61** επιβεβαιώνουν ότι το υβριδικό υλικό SFd@GA επιδεικνύει υψηλότερη ανθεκτικότητα, γεγονός που αποδεικνύεται από την απουσία οποιασδήποτε αλλαγής στην ένταση του σήματος EPR των ριζών OH. Συνολικά, η παρούσα μελέτη αποκαλύπτει ότι τα {SFd@εμβολιασμένα αντιοξειδωτικά} π.χ. ειδικά τα GLA@SFd@GLAM και SFd@GA παρουσιάζουν ισχυρή ανθεκτικότητα έναντι των ριζών OH.



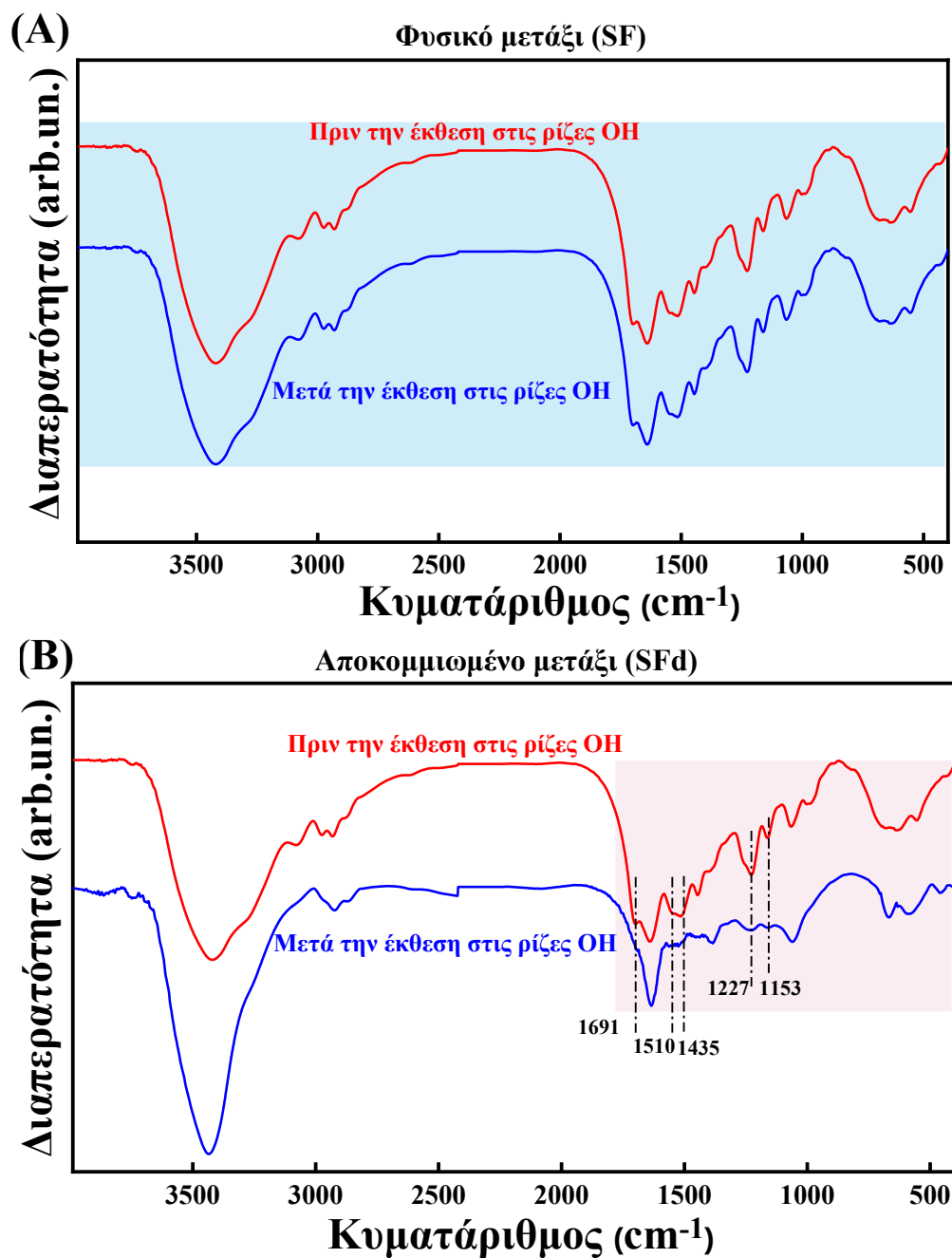
Εικόνα 3-61. Φάσματα EPR στα οποία φαίνεται η προστατευτική επίδραση του υβριδικού υλικού SFd@GA έναντι των ριζών υδροξυλίου που παρήχθησαν από την αντίδραση Fenton, η οποία ξεπερνά αυτή της σερικίνης του φυσικού μεταξιού (SF).

Η **Εικόνα 3-61** δείχνει ότι το μονομερές του γαλλικού οξέος παρουσιάζει αξιοσημείωτα υψηλή ικανότητα δέσμευσης των ριζών υδροξυλίου. Πρακτικά εξουδετερώνει σχεδόν όλη την ποσότητα των ριζών υδροξυλίου που δημιουργούνται μέσω της αντίδρασης Fenton. Αυτό αποδεικνύεται από την άμεση αντίδραση μεταξύ των ριζών ($\bullet\text{OH}$) και του μονομερούς του γαλλικού οξέος, η οποία πραγματοποιείται χωρίς εμφανή αντίσταση.

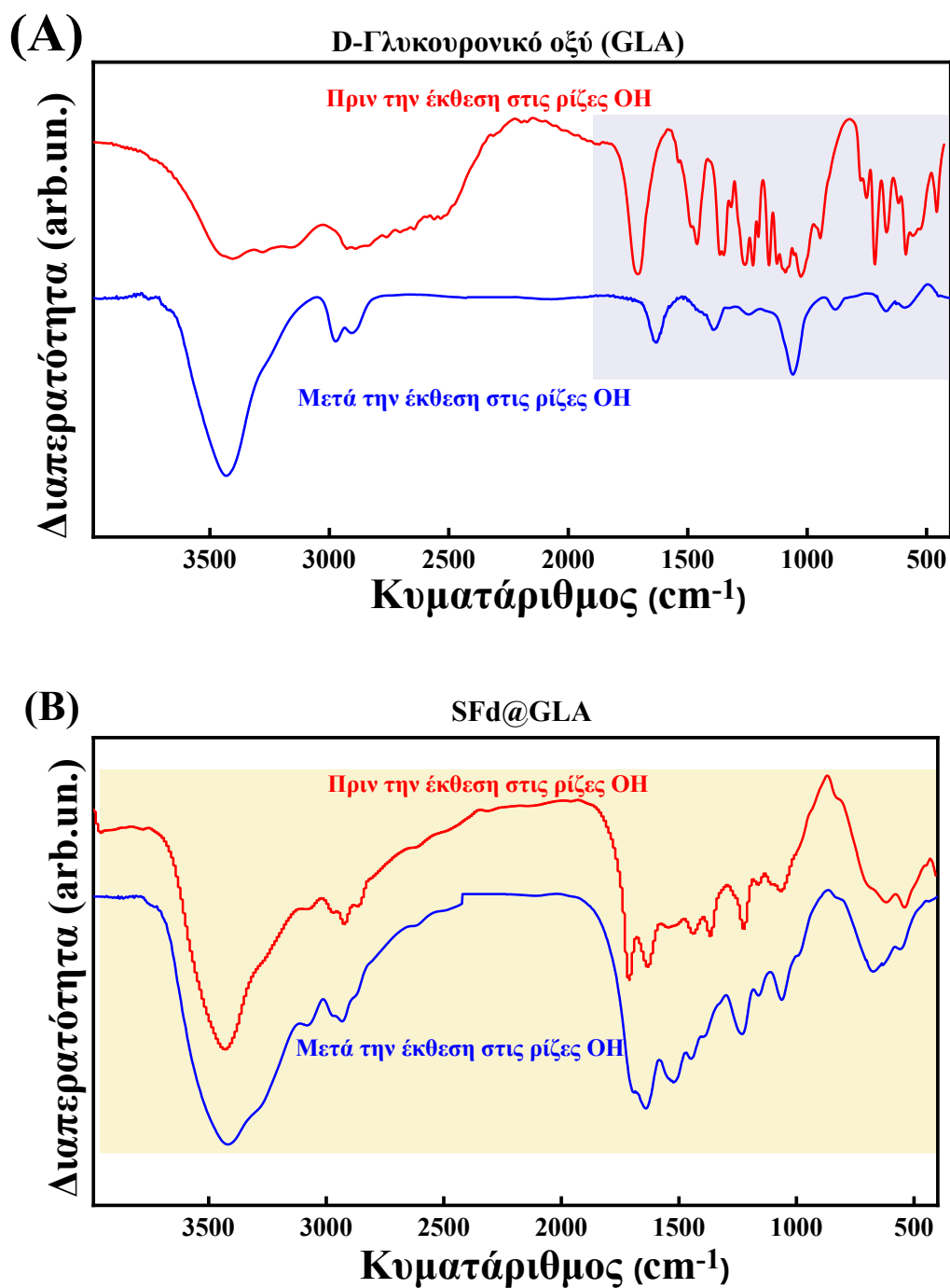
Μέσω υπολογισμών που πραγματοποιήθηκαν, φαίνεται ότι 1gr GA μπορεί να εξουδετερώσει 13200 $\mu\text{mol}^{\bullet}\text{OH}$, ενώ 1 gr SF@GA μπορεί να εξουδετερώσει μηδενική ποσότητα $^{\bullet}\text{OH}$. Η μελέτη μας αποκαλύπτει μια αντι-συσχέτιση μεταξύ της δραστηριότητας έναντι των ριζών OH και της διατήρησης της ικανότητας HAT: δηλαδή υψηλή δραστηριότητα έναντι των $^{\bullet}\text{OH}$ σημαίνει χαμηλή ανθεκτικότητα και απώλεια της αντιοξειδωτικής ικανότητας HAT. Σε αυτό το πλαίσιο, υλικά με χαμηλή δραστηριότητα έναντι του OH παρουσιάζουν αυτοπροστατευτικές ιδιότητες.

3.4.2.6. Συγκριτική μελέτη όλων των υβριδικών υλικών και των ελεύθερων αντιοξειδωτικών έναντι των $^{\bullet}\text{OH}$, μέσω φασματοσκοπίας FT-IR.

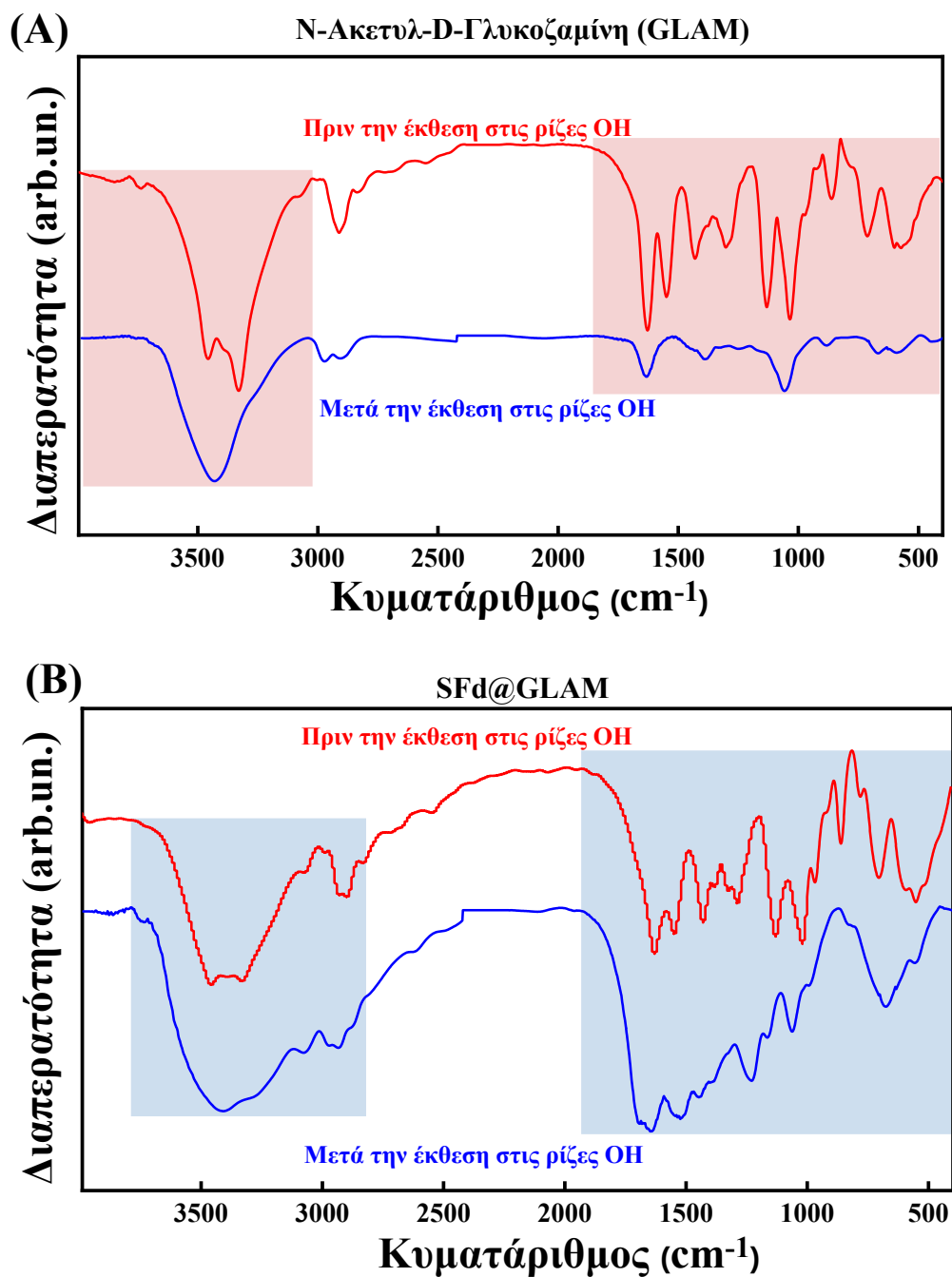
Για καλύτερη κατανόηση της αλληλεπίδρασης των μορίων GLA, GLAM και των υβριδικών υλικών με βάση ίνες μεταξιού με τις ρίζες υδροξυλίου ($^{\bullet}\text{OH}$) χρησιμοποιήσαμε φασματοσκοπία FT-IR, συγκρίνοντας τα φάσματα που ελήφθησαν πριν και μετά την έκθεσή τους σε $^{\bullet}\text{OH}$. Τα φάσματα FT-IR (**Εικόνα 3-62**) αποκαλύπτουν διαφορετικές συμπεριφορές για το φυσικό μετάξι και το αποκομμωμένο μετάξι (SFd) κατά την έκθεση σε ρίζες υδροξυλίου. Πιο συγκεκριμένα, το φάσμα FT-IR του φυσικού μεταξιού (SF) παραμένει αμετάβλητο, (**Εικόνα 3-62 A**), ενώ, το φάσμα του αποκομμωμένου μεταξιού (SFd) παρουσιάζει σημαντική διαταραχή, π.χ. βλέπε ζώνες στα 1691, 1510, 1435, 1227, 1153 cm^{-1} (**Εικόνα 3-62 B**) που αντιστοιχούν σε πρωτεϊνικά συστατικά του. Η σύγκριση αυτή αποκαλύπτει ότι η απομάκρυνση της σερίκνης, η οποία συνήθως χρησιμεύει ως προστατευτικό επίστρωμα, επιτρέπει στο SFd να αλληλεπιδρά άμεσα με τις ρίζες OH και έτσι με αυτό τον τρόπο καταστρέφεται η δομή του. Τα φάσματα FT-IR (**Εικόνα 3-63, Εικόνα 3-64, Εικόνα 3-65**) δείχνουν ότι τα μονομερή GLA, GLAM και GA αποικοδομούνται πλήρως μετά την αλληλεπίδρασή τους με τις ρίζες OH. Αντίθετα, τα υβριδικά υλικά SFd@GLA και SFd@GLAM παρουσιάζουν ελάχιστη αποικοδόμηση, ειδικά στο πρωτεϊνικό τους τμήμα. Πιο συγκεκριμένα, τα φάσματα FT-IR των υβριδικών υλικών SFd@GA και GLA@SFd@GLAM (**Εικόνα 3-65, Εικόνα 3-66**) παραμένουν αμετάβλητα μετά την έκθεσή τους σε ρίζες OH. Η σταθερότητα αυτή αποδίδεται στην προστατευτική δομή του πλέγματός τους, η οποία αναστέλλει την αλληλεπίδραση των ριζών OH με το υβριδικό υλικό.



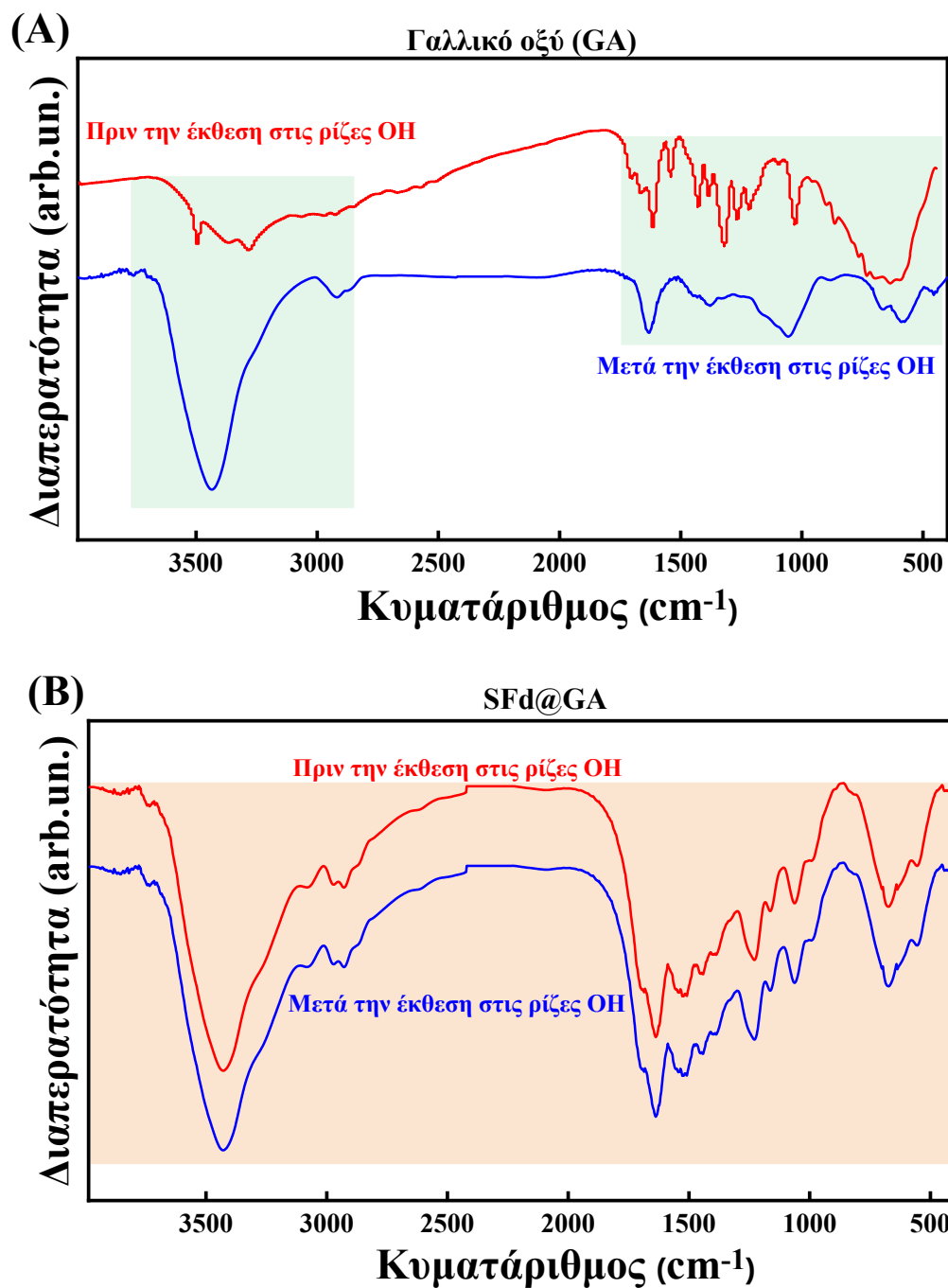
Εικόνα 3-62. Φάσματα FT-IR των υλικών (A) SF και (B) SFd, πριν και μετά την έκθεσή τους σε ρίζες υδροξυλίου. Το φάσμα FT-IR του SFd παρουσιάζει υποβάθμιση, ενώ το φάσμα του φυσικού μεταξιού παραμένει αμετάβλητο, γεγονός που αποδίδεται στην προστασία που προσδίδει η σερικίνη στο φυσικό μετάξι.



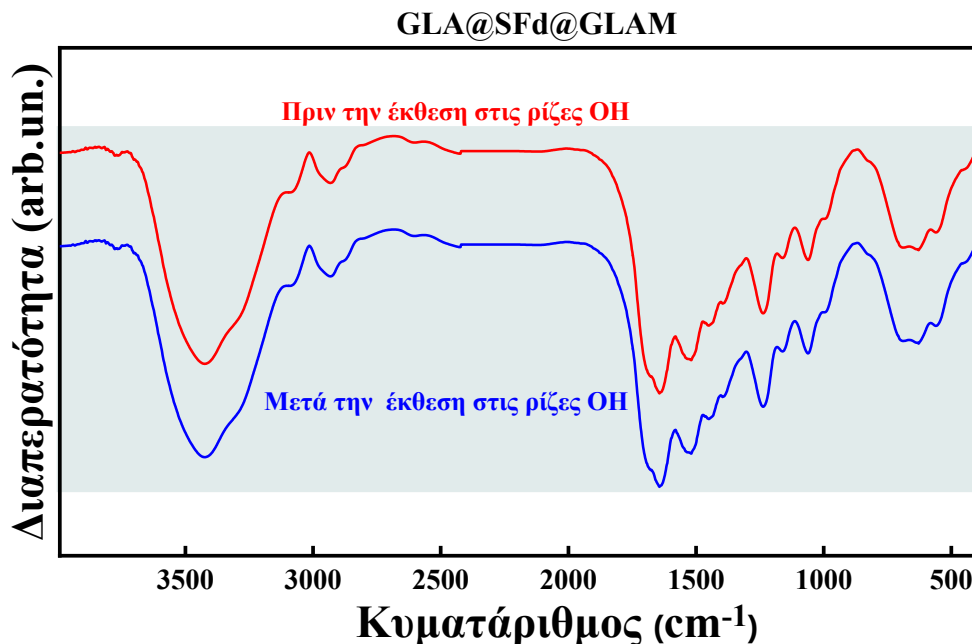
Εικόνα 3-63. Φάσματα FT-IR των υλικών (A) GLA και (B) SFd@GLA, πριν και μετά την έκθεση σε ρίζες υδροξυλίου. Το φάσμα FT-IR του GLA μετά από αυτή την έκθεση παρουσιάζει σημαντική υποβάθμιση, ενώ το φάσμα του υβριδικού υλικού SFd@GLA παρουσιάζει ελάχιστη υποβάθμιση.



Εικόνα 3-64. Φάσματα FT-IR των υλικών (A) GLAM και (B) SFd@GLAM, πριν και μετά την έκθεσή τους σε ρίζες υδροξυλίου. Το φάσμα FT-IR του GLAM μετά από αυτή την έκθεση παρουσιάζει σημαντική υποβάθμιση, ενώ το φάσμα του υβριδικού υλικού SFd@GLAM παρουσιάζει ελάχιστη υποβάθμιση.



Εικόνα 3-65. Φάσματα FT-IR των υλικών (A) GA και (B) SFd@GA, πριν και μετά την έκθεση σε ρίζες υδροξυλίου. Το φάσμα FT-IR του GA μετά από αυτή την έκθεση παρουσιάζει σημαντική υποβάθμιση, ενώ εκείνο του υβριδικού υλικού SFd@GA παραμένει ανεπηρέαστο, γεγονός που αποδίδεται σε προστασία του πλέγματος από το GA που ενσωματώνεται στο υλικό.



Εικόνα 3-66. Φάσμα FT-IR του διπλά εμβολιασμένου υβριδικού υλικού GLA@SFd@GLAM δεν παρουσιάζει διακριτές αλλαγές μετά την έκθεση του υλικού σε $\bullet\text{OH}$ γεγονός που μπορεί να αποδοθεί σε προστασία από τα GLA, GLAM που ενσωματώνονται στο αποκομμωμένο μετάξι.

Ο Πίνακας 3-5 περιλαμβάνει τα ευρήματα από τη μελέτη αλληλεπίδρασης των ριζών υδροξυλίου με τα υβριδικά υλικά με βάση το μετάξι. Τα δεδομένα αυτά αποκαλύπτουν το εξής μοτίβο: τα μονομερή GLA, GLAM, καθώς και το αποκομμωμένο μετάξι SFd, αντιδρούν με τις $\bullet\text{OH}$, δηλαδή είναι επιρρεπή στην αποικοδόμηση/απενεργοποίηση από τις $\bullet\text{OH}$. Από την άλλη πλευρά, τα υβριδικά υλικά SFd@GLA και SFd@GLAM, είναι αδρανή απέναντι στην επίθεση από $\bullet\text{OH}$.

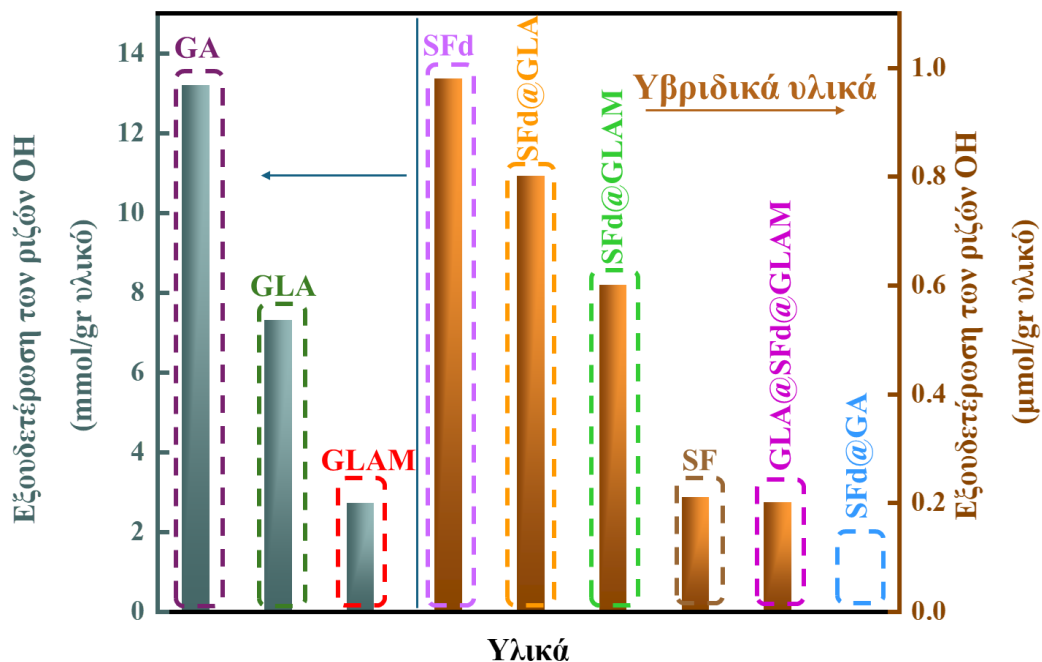
Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 3-67**, μεγαλύτερη δραστικότητα έναντι των ριζών OH εμφανίζουν τα ελεύθερα μόρια GA, GLA, GLAM, καθώς και το αποκομμωμένο μετάξι, ενώ μεγαλύτερη αυτοπροστασία, δηλαδή πολύ μικρή αλληλεπίδραση με τις ρίζες OH εμφανίζουν τα υβριδικά υλικά με μήτρα το αποκομμωμένο μετάξι, καθώς και το φυσικό μετάξι. Τα μονομερή GLA και GLAM, λειτουργούν μάλλον ως θυσιαζόμενα αντιοξειδωτικά έναντι των ριζών υδροξυλίου. Ωστόσο, όταν οι ενώσεις αυτές ακινητοποιούνται στο SFd, είτε μαζί είτε χωριστά, η ικανότητά τους να αντιδρούν με τις ρίζες OH μειώνεται λόγω του σχηματισμού μιας επιφανειακής προστατευτικής ασπίδας με την φιβροΐνη του μεταξιού, δρώντας με αυτόν τον τρόπο ακόμη καλύτερα από τη φυσική σερικίνη. Παρόμοιο φαινόμενο παρατηρείται όταν το γαλλικό οξύ

ακίνητοποιείται στην επιφάνεια του SFd. Αυτή η ακινητοποίηση έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός προστατευτικού δικτύου, προσδίδοντας στο υβριδικό υλικό SFd@GA αυτοπροστατευτικές ιδιότητες που ξεπερνούν αυτές τόσο του GLA@SFd@GLAM όσο και του φυσικού μεταξιού.

Πίνακας 3-5. Δραστικότητα των $\bullet\text{OH}$ με τα μονομερή του υαλουρονικού οξέος, γαλλικό οξύ και τα υβριδικά υλικά με βάση ίνες μεταξιού.

<i>Αντιοξειδωτικό</i>	<i>Εξουδετέρωση $\bullet\text{OH}$ [μmol ανά γραμμάριο υλικού] (± 0.01)</i>	<i>n ($\mu\text{mol OH}/\mu\text{mol}$ αντιοξειδωτικού) ($\pm 0.05 \times 10^{-2}$)</i>
GA	13200	2.24
GLA	7400	1.44
GLAM	2700	0.6
SF	0.21	-
SFd	0.98	-
SFd@GLA	0.8	0.3×10^{-2}
SFd@GLAM	0.6	0.2×10^{-2}
{GLA@SFd@GLAM}* [2:1]	0.20	Για GLA: 0.1×10^{-2} Για GLAM: 0.27×10^{-2}
SFd@GA	0	0

*Η μοριακή αναλογία [2:1] αναφέρεται σε ακινητοποιημένα μόρια [GLA: GLAM] σε SFd με βάση την ανάλυση TGA.



Εικόνα 3-67. Η αριστερή στήλη απεικονίζει την ικανότητα των ελεύθερων μορίων GLA, GLAM και GA να εξουδετερώνουν τις ρίζες υδροξυλίου, ενώ η δεξιά αναδεικνύει την ανθεκτικότητα των υλικών με βάση το μετάξι απέναντι στις ρίζες OH.

3.4.3. Δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης όλων των υβριδικών υλικών μετά την έκθεσή τους σε ρίζες OH παραγόμενες από την αντίδραση Fenton.

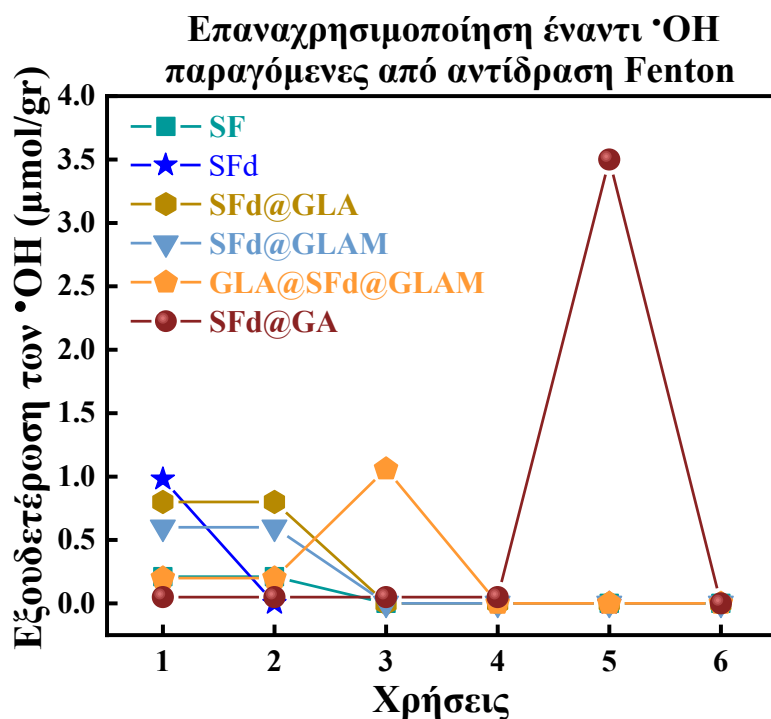
Για να διερευνηθεί η απόκριση των μεταξωτών υλικών σε διαδοχικές εκθέσεις σε ρίζες υδροξυλίου ($\bullet\text{OH}$), πραγματοποιήθηκε μελέτη επαναχρησιμοποίησής τους. Έτσι, μετά την αρχική έκθεση στην αντίδραση Fenton, τα μεταξωτά υλικά αφέθηκαν να στεγνώσουν υπό ατμοσφαιρικό αέρα για 2 λεπτά. Στη συνέχεια, τα υλικά υποβλήθηκαν σε επανειλημμένες εκθέσεις σε ρίζες OH μέχρι να παρατηρηθεί αξιοσημείωτη αλλαγή συμπεριφοράς.

Όταν ένα κλασικό αντιοξειδωτικό αλληλεπιδρά με ρίζες υδροξυλίου ($\bullet\text{OH}$), παρατηρείται μείωση της έντασης του σήματος της ρίζας $\bullet\text{OH}$ στο φάσμα EPR. Το φαινόμενο αυτό αποδίδεται στην εξουδετέρωση των ριζών υδροξυλίου μέσω της αντίδρασής τους με τα αντιοξειδωτικά μόρια. Τα υβριδικά υλικά του μεταξιού, όπως περιγράφηκε προηγουμένως, φέρουν μια προστατευτική δομή στο πλέγμα τους που εμποδίζει την αλληλεπίδραση και την αντίδραση των ριζών υδροξυλίου

με τις αντιοξειδωτικές συνιστώσες. Αυτός ο μηχανισμός θωρακίζει αποτελεσματικά τα υλικά από τις βλαβερές επιδράσεις των $\bullet\text{OH}$.

Το αποκομμωμένο μετάξι (SFd), από το οποίο λείπουν η σερικίνη άρα και το προστατευτικό πλέγμα που προσδίδει η σερικίνη, αντιδρά με τις ρίζες υδροξυλίου κατά την αρχική του χρήση και τις εξουδετερώνει. Ακολουθώς, έχοντας εξαντλήσει τις δραστικές του θέσεις, δεν είναι σε θέση να αλληλεπιδράσει περαιτέρω με τις $\bullet\text{OH}$ και δεν μπορεί να επαναλειτουργήσει (**Εικόνα 3-68**) (**Πίνακας 3-6**). Αντίθετα, το φυσικό μετάξι και τα υβριδικά υλικά SFd@GLA και SFd@GLAM διατηρούν τη συμπεριφορά τους κατά τη δεύτερη χρήση χωρίς ανιχνεύσιμη απώλεια στην απόδοσή τους. Ωστόσο, μετά από έναν τρίτο κύκλο, τα υλικά αυτά παρουσιάζουν σημαντική μείωση της δραστικότητά τους (**Εικόνα 3-68**) (**Πίνακας 3-6**).

Το διπλά εμβολιασμένο υβριδικό υλικό, GLA@SFd@GLAM, διατηρεί την ικανότητά του για αυτοπροστασία έναντι των ριζών υδροξυλίου ($\bullet\text{OH}$) για έως και δύο χρήσεις. Ωστόσο, κατά την τρίτη χρήση, η επαναλαμβανόμενη έκθεση σε $\bullet\text{OH}$ οδηγεί στην αποδόμηση του προστατευτικού του πλέγματος, με αποτέλεσμα, το υβριδικό υλικό να είναι αναγκασμένο πλέον να αλληλεπιδράσει άμεσα με τις $\bullet\text{OH}$ και να τις εξουδετερώσει. Μόλις το υλικό αντιδράσει με τις $\bullet\text{OH}$, η προστατευτική του λειτουργικότητα εξαντλείται, καθιστώντας το ακατάλληλο για περαιτέρω επαναχρησιμοποίηση (**Εικόνα 3-68**) (**Πίνακας 3-6**). Παρόμοια συμπεριφορά παρατηρείται και στο υβριδικό υλικό SFd@GA, με τη διαφορά ότι διατηρεί την αυτοπροστασία του έναντι των ριζών υδροξυλίου ($\bullet\text{OH}$) για έως και τέσσερις χρήσεις. Ωστόσο, κατά τη συνεχή και επαναλαμβανόμενη έκθεση σε ρίζες $\bullet\text{OH}$, η αυτοπροστασία του υβριδικού υλικού SFd@GA υπονομεύεται από την πέμπτη χρήση, οδηγώντας σε μαζική εξουδετέρωση των ριζών υδροξυλίου. Μετά από αυτό, το υλικό χάνει την προστατευτική του ικανότητα και καθίσταται μη επαναχρησιμοποιήσιμο (**Εικόνα 3-68**) (**Πίνακας 3-6**).



Εικόνα 3-68. Πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές επαναχρησιμοποιήσεις των υλικών SF, SFd, SFd@GLA, SFd@GLAM, διπλά εμβολιασμένου GLA@SFd@GLAM και του SFd@GA έναντι $\bullet\text{OH}$ παραγόμενες από αντίδραση Fenton. Μεταξύ των χρήσεων, τα υφάσματα αφήνονται να στεγνώσουν στον αέρα για 2 λεπτά σε συνθήκες περιβάλλοντος. Το καλύτερο όλων είναι το υβριδικό υλικό SFd@GA.

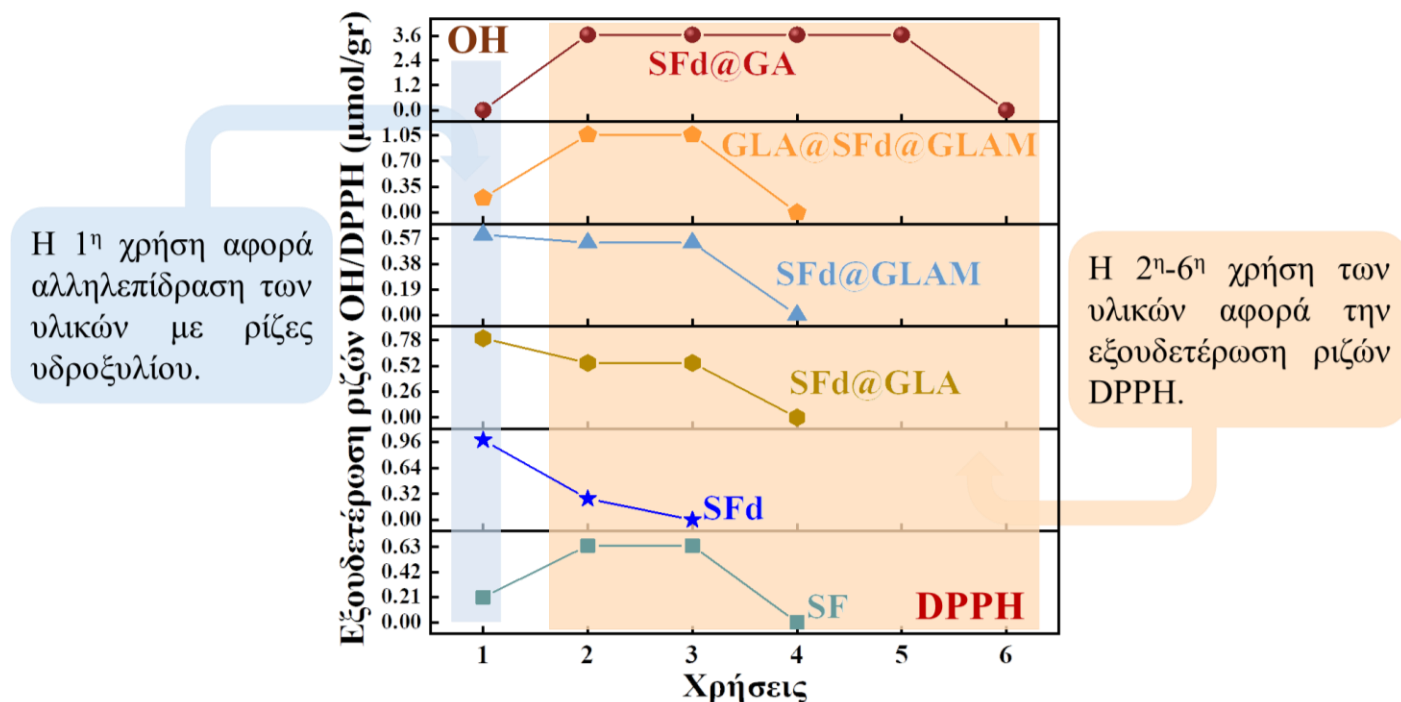
Πίνακας 3-6. Ικανότητα διατήρησης της αυτοπροστασίας των υβριδικών υλικών με βάση ίνες μεταξιού έναντι της συνεχούς έκθεσής τους σε $\bullet\text{OH}$.

Υλικό	Επαναχρησιμοποίηση
SFd	x
SF	1
SFd@GLA	1
SFd@GLAM	1
GLA@SFd@GLAM	2+1
SFd@GA	4+1

Στο προηγούμενο υποκεφάλαιο 3.3.5 πραγματοποιήθηκε αναλυτική συγκριτική μελέτη των υβριδικών υλικών με υλικό υποστήριξης την σίλικα έναντι των ριζών DPPH και OH και αποδείχθηκε ότι υιοθετούνται είτε διαφορετικοί μηχανισμοί, είτε οι ίδιοι μηχανισμοί με τη διαφορά ότι η απόσπαση του ατόμου υδρογόνου πραγματοποιείται από άλλη θέση. Με βάση τα προηγούμενα ευρήματα και με βάση το γεγονός της αυτοπροστασίας των υλικών του μεταξιού θέλαμε να εξετάσουμε αν τα υλικά του μεταξιού, αφού αρχικά υποστούν μια πρώτη έκθεση σε ρίζες OH, μπορούν να χρησιμοποιηθούν και έναντι ριζών DPPH.

3.4.4. Διαδοχική χρήση των μεταξωτών υφασμάτων κατά των ριζών DPPH μετά την αλληλεπίδρασή τους με •OH.

Τα υλικά του μεταξιού, τα οποία είχαν εκτεθεί σε •OH που δημιουργήθηκαν από αντίδραση Fenton, αφέθηκαν στον ατμοσφαιρικό αέρα για μία εβδομάδα και στη συνέχεια αξιολογήθηκαν ως προς την εξουδετέρωση ριζών DPPH. Τα πειράματα διεξήχθησαν ακριβώς όπως περιγράφηκε λεπτομερώς στο πλαίσιο της ενότητας 3.2.1 και τα αντίστοιχα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην **Εικόνα 3-69**. Όλα τα υλικά με βάση ίνες μεταξιού, SF, SFd, SFd@GLA, SFd@GLAM, GLA@SFd@GLAM και SFd@GA έδρασαν έναντι ριζών DPPH παρουσιάζοντας το ίδιο κινητικό προφίλ και την ίδια συμπεριφορά με αυτά που φαίνονται στην **Εικόνα 3-23** και **Εικόνα 3-29**, χωρίς καμία απώλεια της αντιοξειδωτικής τους δράσης. Επιπλέον, όλα τα υλικά, εκτός από το SFd, επαναχρησιμοποιήθηκαν για δεύτερη φορά χωρίς καμία μείωση της δραστηρότητάς τους. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η δομή του μεταξιού και, επομένως, η αντιοξειδωτική τους HAT δραστηρότητα παραμένει άθικτη, υποδεικνύοντας ότι η επιφανειακή σερικίνη, το D-Γλυκουρονικό οξύ, η N-ακετυλ-D-γλυκοζαμίνη και το γαλλικό οξύ προστατεύουν πραγματικά τα μεταξωτά υφάσματα από τις ρίζες OH και έτσι αυτά μπορούν να επαναχρησιμοποιηθούν ως αντιοξειδωτικά κατά των ριζών DPPH. Πάλι και εδώ το καλύτερο από όλα τα υλικά, είναι το υβριδικό υλικό SFd@GA, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί έως και 5 φορές χωρίς καμία μείωση της αντιοξειδωτικής του δράσης (**Εικόνα 3-69**).



Εικόνα 3-69. Η πρώτη χρήση (γαλάζιο τμήμα) αφορά τις αλληλεπιδράσεις όλων των υλικών με ρίζες υδροξυλίου ($\bullet\text{OH}$), ενώ το πορτοκαλί τμήμα απεικονίζει τις αλληλεπιδράσεις των υλικών με ρίζες DPPH, μετά την αρχική τους έκθεση σε ρίζες OH.

3.4.5. Συζήτηση σχετικά με την ικανότητα εξουδετέρωσης ριζών DPPH μέσω HAT & την προστατευτική δράση έναντι ριζών OH.

Τα μονομερή D-Γλυκουρονικό οξύ και N-ακετυλ-D-γλυκοζαμίνη δεν παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση έναντι των ριζών DPPH. Αντίθετα, τα υβριδικά υλικά SFd@GLA και SFd@GLAM επιδεικνύουν σημαντική αντιοξειδωτική δράση έναντι των ριζών DPPH. Τόσο το D-Γλυκουρονικό οξύ, όσο και η N-ακετυλ-D-γλυκοζαμίνη καθώς και τα υβριδικά υλικά SFd@GLA και SFd@GLAM αλληλεπιδρούν με τις ρίζες DPPH μέσω μηχανισμού **Μεταφοράς Ατόμου Υδρογόνου (HAT)**, όπου ένα άτομο υδρογόνου μεταφέρεται στη ρίζα DPPH από ένα άτομο OH του σακχάρου^{291,296}. Αυτό αναλύθηκε λεπτομερώς στην ενότητα 3.3.5.

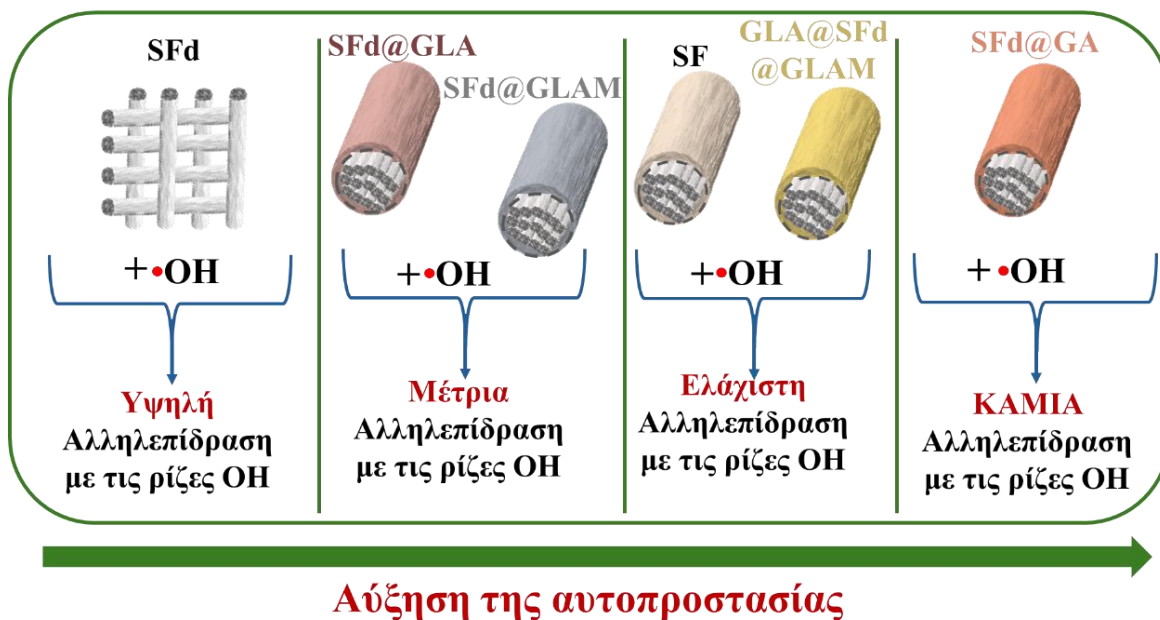
Αντίθετα, όσον αφορά τις ρίζες OH, το D-Γλυκουρονικό οξύ και η N-ακετυλ-D-γλυκοζαμίνη, είτε είναι ακινητοποιημένα είτε όχι, λειτουργούν επίσης μέσω μηχανισμού **Μεταφοράς Ατόμου Υδρογόνου (HAT)**, ωστόσο, σε αυτή την περίπτωση, το **άτομο υδρογόνου** μεταφέρεται από ένα **δεσμό CH** και όχι από ένα OH, όπως παρατηρείται στις ρίζες DPPH. Κατά συνέπεια, τα μονομερή GLA και GLAM παρουσιάζουν σημαντική αντιοξειδωτική δράση έναντι των ριζών OH, αλλά δεν παρουσιάζουν καμία δράση έναντι των ριζών DPPH ²⁹⁶. Λόγω των διαφόρων αλληλεπιδράσεων μεταξύ GLA, GLAM και της μεταξωτής μήτρας, στα υβριδικά υλικά SFd@GLA και SFd@GLAM, η ενσωμάτωση GLA και GLAM στην επιφάνεια της μεταξωτής μήτρας προσδίδει προστατευτική δράση έναντι των ριζών •OH.

Στην περίπτωση του διπλά εμβολιασμένου υβριδικού υλικού GLA@SFd@GLAM, τα μονομερή GLA και GLAM λειτουργούν συνεργιστικά για την ενίσχυση των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων. Συγκεκριμένα, η συνέργεια αυτή αυξάνει την ικανότητα εξουδετέρωσης των ριζών DPPH και βελτιώνει την προστατευτική δράση έναντι των ριζών OH.

Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι το υβριδικό υλικό SFd@GA επιδεικνύει την υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση έναντι των ριζών DPPH σε σύγκριση με όλα τα υλικά, καθώς και ενισχυμένες προστατευτικές ιδιότητες έναντι των ριζών υδροξυλίου (•OH). Το γαλλικό οξύ απομακρύνει τις ρίζες DPPH μέσω μηχανισμού **Μεταφοράς Ατόμου Υδρογόνου (HAT)**, όπου το άτομο υδρογόνου προσφέρεται μέσω **ομάδας υδροξυλίου**. Αντίθετα, όταν αλληλεπιδρά με **ρίζες OH**, το γαλλικό οξύ λειτουργεί μέσω μηχανισμού **Μεταφοράς Ενός Ηλεκτρονίου (SET)** ²⁹⁶.

Επιπλέον, τα αποτελέσματα από την επαναχρησιμοποίηση των υλικών SF, SFd, SFd@GLA, SFd@GLAM, του διπλά εμβολιασμένου GLA@SFd@GLAM και του υβριδικού υλικού SFd@GA έναντι ριζών DPPH μετά από αρχική έκθεση σε ρίζες OH παραγόμενες από αντίδραση Fenton αποδεικνύουν ότι η **Μεταφορά Ατόμου Υδρογόνου** πραγματοποιείται μέσω **διαφορετικών ατόμων** ή μέσω **διαφορετικών μηχανισμών**, εξηγώντας γιατί τα υλικά αυτά εξακολουθούν να είναι ενεργά έναντι ριζών DPPH. Έτσι, η άποψη ότι κατά την αντίδραση με **ρίζες DPPH**, το **άτομο υδρογόνου** αφαιρείται από ένα **OH** εντός του δακτυλίου του σακχάρου, ενώ, στην αντίδραση με τις **ρίζες OH**, το **άτομο υδρογόνου** αφαιρείται από ένα **CH** του δακτυλίου του σακχάρου, φαίνεται να ισχύει και εδώ.

Όπως συζητήθηκε προηγουμένως, η αφαίρεση της σερικίνης από το μετάξι φαίνεται να οδηγεί στην απώλεια των αυτοπροστατευτικών ιδιοτήτων του μεταξιού, επιβάλλοντας έτσι την αλληλεπίδρασή του με ρίζες υδροξυλίου. Όταν τα αντιοξειδωτικά GLA και GLAM ακινητοποιούνται στην επιφάνεια του SFd, η αυτοπροστασία αποκαθίσταται, ωστόσο η προστασία αυτή δεν επαρκεί για να αποτρέψει πλήρως την επίθεση των ριζών υδροξυλίου στο μετάξι. Το φυσικό μετάξι και το διπλά ακινητοποιημένο υβριδικό υλικό GLA@SFd@GLAM επιδεικνύουν σημαντικά υψηλή αυτοπροστασία, επιτρέποντας μόνο ελάχιστη αλληλεπίδραση με ρίζες υδροξυλίου. Τα αποτελέσματα αυτά απεικονίζονται σαφώς στην **Εικόνα 3-70**. Τέλος, το υβριδικό υλικό SFd@GA επιδεικνύει εξαιρετικά υψηλή αυτοπροστασία, αποτρέποντας οποιαδήποτε αλληλεπίδραση με ρίζες υδροξυλίου (**Εικόνα 3-70**). Επομένως, το επίπεδο αυτοπροστασίας φαίνεται να συσχετίζεται άμεσα με την αποτελεσματικότητα του αντιοξειδωτικού μορίου που είναι ακινητοποιημένο στην επιφάνεια του μεταξιού.



Εικόνα 3-70. Απεικόνιση των διαφόρων υλικών του μεταξιού και του αντίστοιχου βαθμού αλληλεπίδρασής τους με τις ρίζες υδροξυλίου ($\bullet\text{OH}$) σε συσχέτιση με την αντιοξειδωτική αυτοπροστασία τους.

3.4.6. Συμπεράσματα

Πραγματοποιήθηκε με επιτυχία η μελέτη της αλληλεπίδρασης των υβριδικών υλικών SFd@GLA, SFd@GLAM, του διπλά εμβολιασμένου υβριδικού υλικού GLA@SFd@GLAM καθώς και του υβριδικού υλικού SFd@GA, με ρίζες υδροξυλίου. Τα υβριδικά υλικά SFd@GLA και SFd@GLAM επιδεικνύουν αντιοξειδωτικές αυτοπροστατευτικές ιδιότητες- ωστόσο, δεν είναι πλήρως ανθεκτικά στην επίθεση των ριζών OH. Αντίθετα, τόσο το υβριδικό υλικό GLA@SFd@GLAM όσο και το φυσικό μετάξι παρουσιάζουν ισχυρή αντιοξειδωτική αυτοπροστασία, επιτρέποντας ελάχιστη αλληλεπίδραση με τις $\bullet\text{OH}$.

Το υβριδικό υλικό SFd@GA εμφάνισε την πιο αποτελεσματική αντιοξειδωτική αυτοπροστασία, αποτρέποντας οποιαδήποτε αλληλεπίδραση με τις ρίζες OH. Επιπλέον, το SFd@GA διατηρεί την αυτοπροστατευτική του ικανότητα για τέσσερις κύκλους, μετά από τους οποίους αρχίζει να αλληλεπιδρά με τις ρίζες OH και να τις εξουδετερώνει με αποτέλεσμα πιθανώς τη θυσία των επιφανειακών θέσεων.

**Κεφάλαιο 3: Τέταρτο Μέρος: Σύνθεση και
αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης των
υβριδικών υλικών $\text{SiO}_2@\text{sericin}$ (10%) και
 $\text{SiO}_2@\text{sericin}$ (20%)**

3.5. Σύνθεση και χαρακτηρισμός υβριδικών υλικών που έχουν ως υλικό υποστήριξης σίλικα και ως αντιοξειδωτικό τη σερικίνη του μεταξιού: SiO₂@sericin (10%) και SiO₂@sericin (20%)

3.5.1. Εισαγωγή

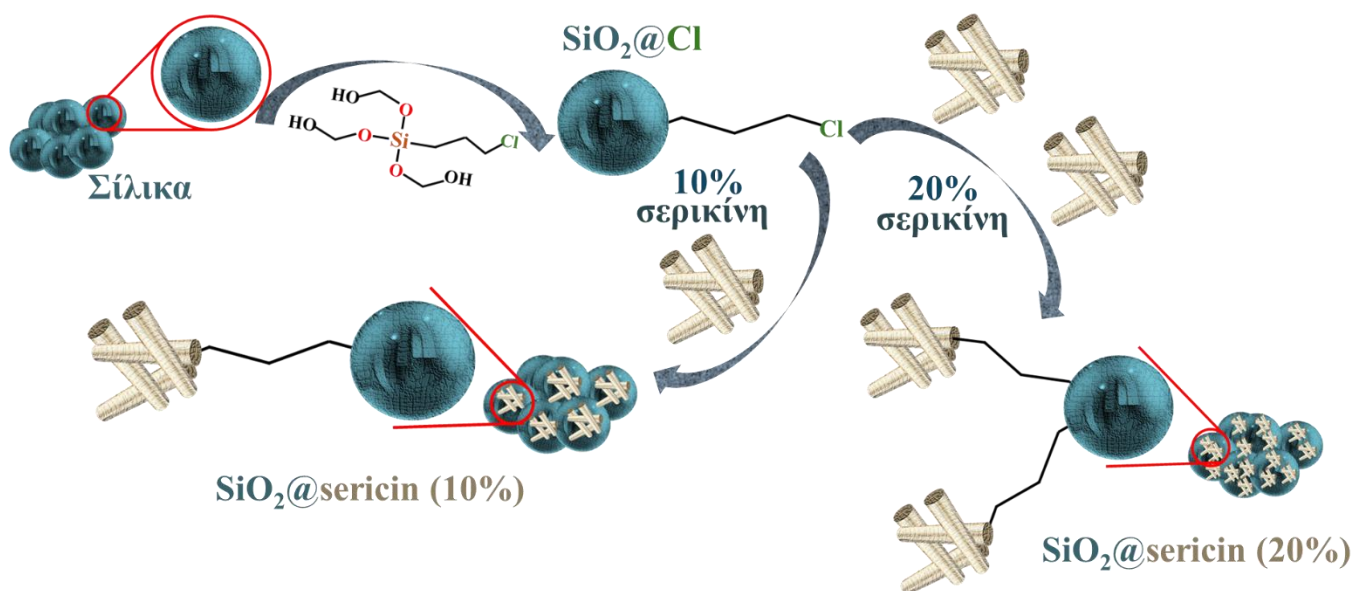
Έχοντας υπόψιν μας τις διαφορές σε ότι αφορά την αλληλεπίδραση με τις ρίζες υδροξυλίου των υβριδικών υλικών που έχουν ως υλικό υποστήριξης τη σίλικα και ως υλικό υποστήριξης το μετάξι, αποφασίσαμε να συνθέσουμε υβριδικά υλικά που έχουν ως υλικό υποστήριξης τη σίλικα (SiO₂) και την πρωτεΐνη σερικίνη ως αντιοξειδωτικό. Τα υβριδικά υλικά SiO₂@sericin (φόρτωση 10%) και SiO₂@sericin (φόρτωση 20%) αξιολογήθηκαν ως προς την ικανότητά τους να εξουδετερώνουν τις ρίζες DPPH χρησιμοποιώντας φασματοφωτόμετρο UV-Vis και ως προς την ικανότητά τους να απομακρύνουν τις ρίζες OH χρησιμοποιώντας φασματοσκοπία EPR.

3.5.2. Σύνθεση του υβριδικού υλικού SiO₂@sericin (10% φόρτωση).

Αρχικά 2.78 gr SiO₂ ξηράθηκαν στους 140 °C για 24 ώρες και ακολούθως διασπάρθηκε σε 15 mL μεθανόλης και το αιώρημα υποβλήθηκε σε υπερήχους για 5 λεπτά. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 2,5 mL (3-χλωροπροπυλο)τριμεθοξυσιλάνιο στο μείγμα που αφέθηκε για ανάδευση υπό αναρροή για 24 ώρες στους 60 °C. Το υλικό που ανακτήθηκε με φυγοκέντρηση πλύθηκε με μεθανόλη και ακετόνη και αφέθηκε για ξήρανση 24 ώρες στους 40 °C. Έτσι συντέθηκε το πρόδρομο υλικό SiO₂@Cl (**Εικόνα 3-71**). Στη συνέχεια, 1.6 gr SiO₂@Cl διασπάρθηκαν σε 17 mL υδατικού διαλύματος σερικίνης (5-10%) και το αιώρημα επώαστηκε σε υπερήχους με ήπια ανάδευση για 5 λεπτά. Ακολούθως υποβλήθηκε σε ανάδευση υπό αναρροή στους 80-85 °C για 24 ώρες. Το υβριδικό υλικό ανακτήθηκε με φυγοκέντρηση και πλύθηκε με μεθανόλη και ακετόνη. Το προκύπτον υβριδικό υλικό SiO₂@sericin (10%) ξηράθηκε για 24 ώρες στους 40 °C πριν χρησιμοποιηθεί (**Εικόνα 3-71**)

3.5.3. Σύνθεση του υβριδικού υλικού $\text{SiO}_2@\text{sericin}$ (20% φόρτωση).

Το υβριδικό υλικό $\text{SiO}_2@\text{sericin}$ (20%) συντέθηκε με ανάλογη μεθοδολογία όπως αυτή του υβριδικού υλικού $\text{SiO}_2@\text{sericin}$ (10%) με μικρές αλλαγές στο πρωτόκολλο. 1.25 gr ξηρής SiO_2 διασπάρθηκαν σε 20 mL μεθανόλης και το αιώρημα υποβλήθηκε σε υπερήχους για 5 λεπτά και ακολούθως στο αιώρημα προστέθηκε 1 mL (3-χλωροπροπυλο)τριμεθοξυσιλάνιο. Το μίγμα αναδεύτηκε υπό αναρροή στους 60 °C για 24 ώρες. Το υλικό που ανακτήθηκε με φυγοκέντρηση πλύθηκε με μεθανόλη και ακετόνη και αφέθηκε για ξήρανση 24 ώρες στους 40 °C. Μέσω αυτή της διαδικασίας συντέθηκε το πρόδρομο υλικό $\text{SiO}_2@\text{Cl}$. Έπειτα, 0.5 gr καθαρού και ξηρού $\text{SiO}_2@\text{Cl}$ διασπάρθηκαν σε 21 mL υδατικού διαλύματος σερικίνης (5-10%) και το αιώρημα επωάστηκε σε υπερήχους για 5 λεπτά. Στη συνέχεια, το μίγμα υποβλήθηκε σε ανάδευση υπό αναρροή στους 80-85 °C για 48 ώρες. Το υβριδικό υλικό $\text{SiO}_2@\text{sericin}$ (20%) που ανακτήθηκε μετά την φυγοκέντρηση ξεπλύθηκε με μεθανόλη και ακετόνη και ξηράνθηκε υπό κενό στους 40 °C για 24 ώρες (Εικόνα 3-71).



Εικόνα 3-71. Σχηματική απεικόνιση της σύνθεσης του πρόδρομου υλικού $\text{SiO}_2@\text{Cl}$ και των υβριδικών υλικών $\text{SiO}_2@\text{sericin}$ (με 10% φόρτωση της σερικίνης στην σίλικα) και $\text{SiO}_2@\text{sericin}$ (με 20% φόρτωση της σερικίνης στην σίλικα).

3.5.4. Χαρακτηρισμός των υβριδικών υλικών της σερικίνης με μήτρα τη σίλικα.

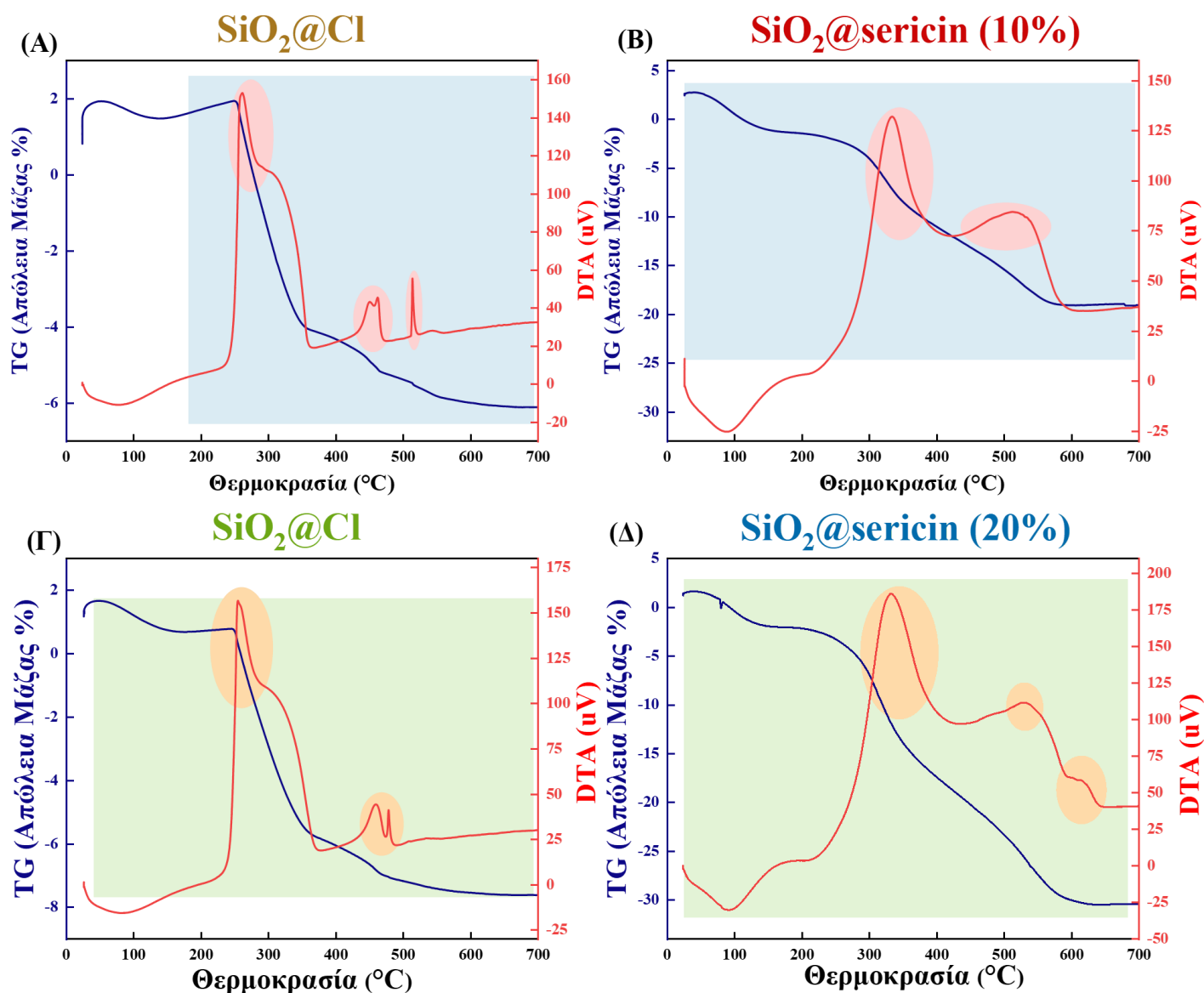
3.5.4.1. Θερμοσταθμική Διαφορική Θερμική Ανάλυση (TG-DTA)

Στην **Εικόνα 3-72** φαίνεται η θερμοβαρυμετρική ανάλυση των πρόδρομων υλικών $\text{SiO}_2@\text{Cl}$ και των υβριδικών υλικών $\text{SiO}_2@\text{sericin}$ (με 10% σερικίνη) και $\text{SiO}_2@\text{sericin}$ (με 20% σερικίνη). Στα θερμογραφήματα που απεικονίζονται παρακάτω, η κόκκινη γραμμή απεικονίζει τις εξώθερμες και ενδόθερμες μεταβάσεις που παρατηρήθηκαν στη διαφορική θερμική ανάλυση (DTA), ενώ η μπλε γραμμή αναπαριστά το αθροιστικό προφίλ απώλειας μάζας των υπό μελέτη υλικών (**Εικόνα 3-72**).

Για το υβριδικό υλικό $\text{SiO}_2@\text{sericin}$ (με 10% σερικίνη): Η θερμική ανάλυση του $\text{SiO}_2@\text{Cl}$ πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασίες από 20 °C έως 700 °C, με ρυθμό 10 °C/min και υπό ροή συνθετικού αέρα. Το θερμογράφημα του υλικού $\text{SiO}_2@\text{Cl}$ φαίνεται στην **Εικόνα 3-72Α**. Η συνολική απώλεια μάζας από 200 έως 700 °C είναι 7.8% που αντιστοιχεί σε 1.1 mmol $\text{Cl}(\text{CH}_2)_3/\text{gr SiO}_2@\text{Cl}$. Η εξώθερμη αλλαγή που εμφανίζεται στην περιοχή 250-350 °C οφείλεται στην καύση του οργανικού φορτίου του υλικού. Η θερμική ανάλυση του πρώτου υβριδικού υλικού $\text{SiO}_2@\text{sericin}$ έλαβε χώρα σε θερμοκρασίες από 20 °C έως 700 °C, με ρυθμό 10 °C/min, και υπό ροή οξυγόνου. Η συνολική απώλεια μάζας από 200 °C έως 700 °C είναι 17.6%. Ωστόσο, δεδομένου ότι το υβριδικό υλικό $\text{SiO}_2@\text{sericin}$ προέρχεται από το $\text{SiO}_2@\text{Cl}$, πρέπει να αφαιρεθεί το 7.8%, αφήνοντας έτσι ένα ποσοστό της τάξης του 9.7%, που αντιστοιχεί σε 97.4 mg σερικίνης/γραμμάριο υλικού $\text{SiO}_2@\text{sericin}$. Βάσει αυτού το παρόν υβριδικό υλικό κωδικοποιείται ως $\text{SiO}_2@\text{sericin}$ (10%), υπονοώντας τη φόρτωση 10% της σερικίνης στη σίλικα. Στο θερμογράφημα η εξώθερμη αλλαγή που εμφανίζεται στην περιοχή 270-350 °C οφείλεται στην καύση του οργανικού φορτίου του υβριδικού υλικού **Εικόνα 3-72Β**.

Για το υβριδικό υλικό $\text{SiO}_2@\text{sericin}$ (με 20% σερικίνη): Το θερμογράφημα του υλικού $\text{SiO}_2@\text{Cl}$ φαίνεται στην **Εικόνα 3-72Γ**. Η αθροιστική απώλεια μάζας για το υλικό $\text{SiO}_2@\text{Cl}$ από τους 200 έως τους 700 °C είναι 8.3%, που αντιστοιχεί σε 1.2 mmol $\text{Cl}(\text{CH}_2)_3$ ανά γραμμάριο $\text{SiO}_2@\text{Cl}$. Η θερμική ανάλυση του δεύτερου δείγματος του υβριδικού υλικού $\text{SiO}_2@\text{sericin}$ παρουσιάζεται στην **Εικόνα 3-72Δ**. Η συνολική απώλεια μάζας αντιστοιχεί σε 28.2%, όμως δεδομένου ότι το υβριδικό υλικό $\text{SiO}_2@\text{sericin}$ προέρχεται από $\text{SiO}_2@\text{Cl}$, πρέπει να αφαιρεθεί το 8.3% που σχετίζεται με το $\text{SiO}_2@\text{Cl}$, με αποτέλεσμα μια καθαρή απώλεια μάζας της τάξης του

19.9% που αντιστοιχεί σε 199 mg σερίκινης ανά γραμμάριο υλικού SiO₂@sericin. Με βάση τα δεδομένα της ανάλυσης το δεύτερο υβριδικό υλικό κωδικοποιείται ως SiO₂@sericin (20%), λόγω της φόρτωσης 20% σερίκινης στη σίλικα.



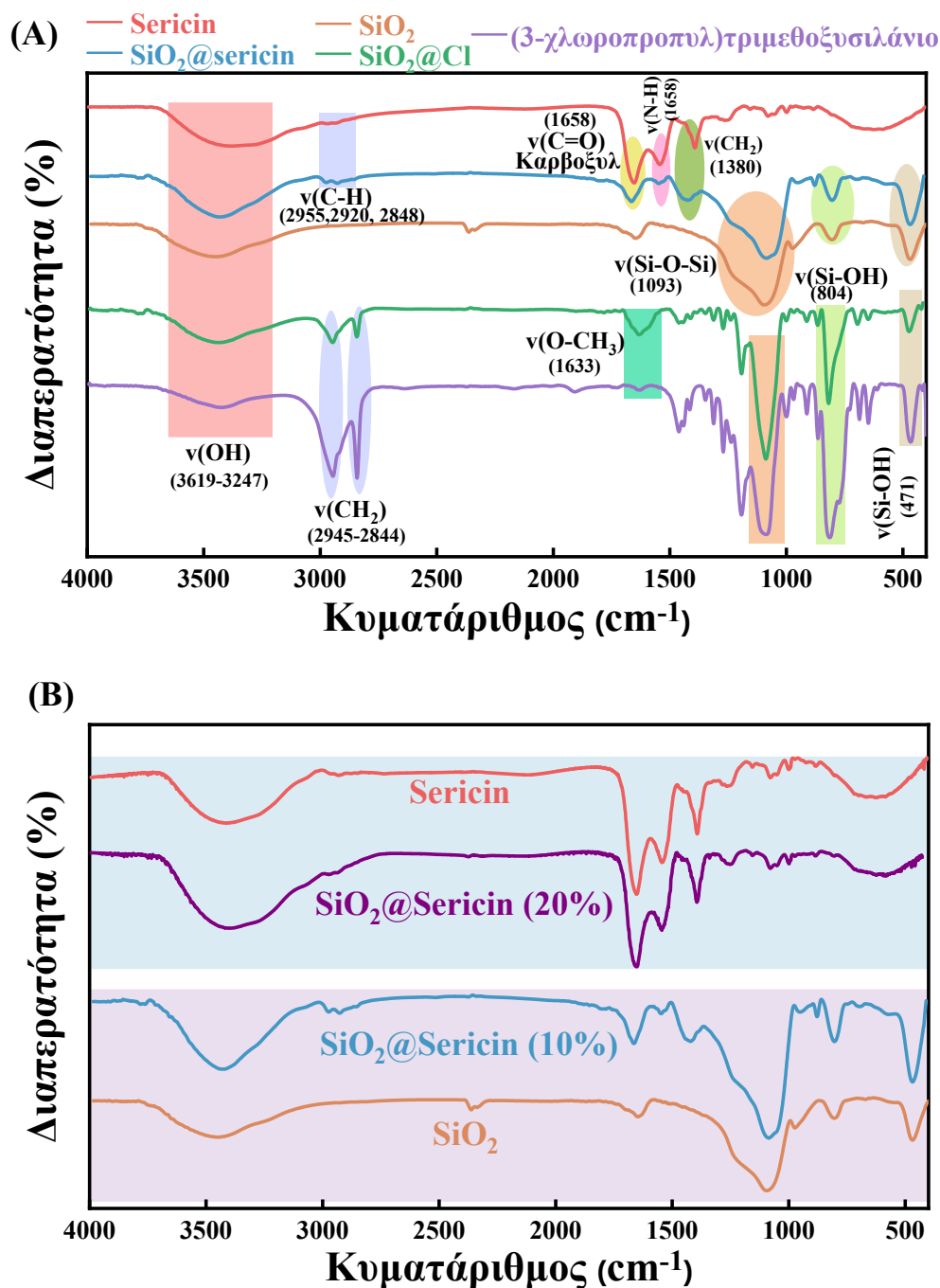
Εικόνα 3-72. Η θερμοβαρυμετρική (TG) και η διαφορική θερμική ανάλυση (DTA) πραγματοποιήθηκαν στα ακόλουθα δείγματα: (A) SiO₂@Cl, (B) SiO₂@sericin (10%), (Γ) SiO₂@Cl, και (Δ) SiO₂@sericin (20%) Η γαλάζια περιοχή υποδηλώνει τη συνολική απώλεια βάρους.

3.5.4.2. Φασματοσκοπία FT-IR

Στην **Εικόνα 3-73 Α** παρουσιάζονται τα φάσματα FTIR για το υβριδικό υλικό SiO₂@sericin (φόρτωση 10%) και SiO₂@Cl, μαζί με τα φάσματα για την ελεύθερη σερικίνη και τα σωματίδια SiO₂. Το φάσμα FT-IR της SiO₂ χαρακτηρίζεται από κορυφές στα 467, 815 και 1089 cm⁻¹, οι οποίες αντιστοιχούν στις δονήσεις (R), στις συμμετρικές δονήσεις τάσης (SS) και στις ασύμμετρες δονήσεις τάσης (AS) του δεσμού Si-O-Si του δικτύου της σίλικα, αντίστοιχα ^{236,297}.

Το φάσμα FT-IR του (3-χλωροπροπυλο)τριμεθοξυσιλανίου στην **Εικόνα 3-73 Α** αναπαρίσταται με τη μωβ γραμμή, όπου παρατηρείται μια ευρεία πεπλατυσμένη κορυφή στην περιοχή 3424 έως 3247 cm⁻¹, που αντιστοιχεί στη δόνηση τάσης του δεσμού O-H. Οι κορυφές που παρατηρούνται στα 2973 cm⁻¹ και 2920 cm⁻¹ αποδίδονται στις ασύμμετρες ταλαντώσεις τάσης των δεσμών ν(C-H) ²⁶⁹. Επιπλέον, οι κορυφές στα 2858 και 2854 cm⁻¹ αποδίδονται στις συμμετρικές δονήσεις τάσης των δεσμών ν (C-H). Η κορυφή που παρατηρείται στα 1633 cm⁻¹ δηλώνει την παρουσία του δεσμού ν (O-CH₃). Επιπλέον, η παρουσία ασύμμετρων δονήσεων των δεσμών δ (C-H) υποδεικνύεται από τις κορυφές στα 1440 και 1381 cm⁻¹. Τέλος, οι κορυφές που παρατηρούνται στα 873 cm⁻¹ και 470 cm⁻¹ αντιστοιχούν στις χαρακτηριστικές συμμετρικές (SS) και ασύμμετρες δονήσεις τετρώματος (AS) του δεσμού Si-O-Si, αντίστοιχα ^{236,297} (**Εικόνα 3-73 Α**). Το φάσμα FT-IR του υλικού SiO₂@Cl στην **Εικόνα 3-73 Α** παρουσιάζεται με πράσινο χρώμα και χαρακτηρίζεται από την παρουσία χαρακτηριστικών κορυφών που προέρχονται τόσο από την ομάδα – (CH₂)₃Cl, όσο και από τη σίλικα επιβεβαιώνοντας την επιτυχή ακινητοποίηση του οργανοσιλανίου στην επιφάνειά της.

Το φάσμα FT-IR της πρωτεΐνης σερικίνης παρουσιάζεται στην **Εικόνα 3-73 Α** με κόκκινο χρώμα. Η ευρεία κορυφή που παρατηρείται στα 3420cm⁻¹ αποδίδεται στις δονήσεις τάσης των δεσμών ν(OH). Οι κορυφές στα 2974, 2928 και 2854 cm⁻¹ αποδίδονται στις ταλαντώσεις τάσης των δεσμών ν(C-H) στην σερικίνη ²⁶⁵. Επιπλέον, η κορυφή στα 1658 cm⁻¹ αποδίδεται στις ταλαντώσεις τάσης των δεσμών ν(C=O), που σχετίζονται ειδικά με τη ζώνη Αμιδίου Ι στη δομή β-φύλλου ^{202,265}. Οι κορυφές που παρατηρούνται στα 1640, 1438 και 1238 cm⁻¹ αποδίδονται σε διακριτές δονήσεις αμιδικών δεσμών: αυτή στα 1438 cm⁻¹ αποδίδεται στο Αμίδιο II, που περιλαμβάνει δόνηση παραμόρφωσης δ(N-H) και τάσης ν(C-N), εκείνη στα 1238 cm⁻¹ συνδέεται με το Αμίδιο III, που περιλαμβάνει δόνηση τάσης ν(C-N) και παραμόρφωσης δ(N-H) ^{202,265}.



Εικόνα 3-73. Φάσματα FT-IR για (A) το (3-χλωροπροπυλο)τριμεθοξυσιλάνιο (ανοιχτή μοβ γραμμή), τη SiO₂ (ανοιχτή καφέ γραμμή), το SiO₂@Cl (πράσινη γραμμή), τη σερικίνη (κόκκινη γραμμή) και το υβριδικό υλικό SiO₂@sericin (10%) (ανοιχτή μπλε γραμμή), (B) τη σερικίνη (κόκκινη γραμμή), το υβριδικό υλικό SiO₂@sericin (20%) (μοβ γραμμή), το υβριδικό υλικό SiO₂@sericin (10%) (ανοιχτή μπλε γραμμή) και τη SiO₂ (ανοιχτή καφέ γραμμή).

Στην **Εικόνα 3-73 Α**, το γαλάζιο φάσμα καταδεικνύει την επιτυχή ακινητοποίηση της πρωτεΐνης σερικίνης στην επιφάνεια της σίλικα, όπως αποδεικνύεται από την παρουσία χαρακτηριστικών κορυφών που αντιστοιχούν τόσο στη σερικίνη όσο και στη σίλικα, όπως αναλύθηκε προηγουμένως. Η ευρεία κορυφή που παρατηρείται στα 3420cm^{-1} αποδίδεται στις δονήσεις τάσης των δεσμών $\nu(\text{OH})$. Οι κορυφές που παρατηρούνται στα 2974 , 2928 και 2854 cm^{-1} αντιστοιχούν στις ταλαντώσεις τάσης των δεσμών $\nu(\text{C-H})$ της πρωτεΐνης της σερικίνης²⁶⁵. Επιπλέον, η κορυφή που παρατηρείται στα 1658 cm^{-1} αποδίδεται στις δονήσεις τάσης των δεσμών $\nu(\text{C=O})$, οι οποίες είναι χαρακτηριστικές της ζώνης Αμιδίου Ι στη δομή β-φύλλου²⁶⁵. Οι κορυφές που παρατηρούνται στα 1658 , 1535 και 1380 cm^{-1} αντιστοιχούν στο σχηματισμό δεσμών αμιδίων, συγκεκριμένα Αμιδίου Ι ($\nu\text{ C=O}$), Αμιδίου ΙΙ ($\delta\text{ N-H}$ παραμόρφωση και $\nu\text{ C-N}$) και Αμιδίου ΙΙΙ ($\nu\text{ C-N}$ και $\delta\text{ N-H}$ παραμόρφωση), αντίστοιχα²⁶⁵. Αυτές οι κορυφές εμφανίζονται μετατοπισμένες σε σχέση με το φυσικό μετάξι (1640 , 1438 και 1238 cm^{-1} αντίστοιχα), λόγω της αποδιοργάνωσης της σερικίνης. Τέλος, βλέπουμε και τρεις κορυφές στα 467 , 815 και 1089 cm^{-1} που αντιστοιχούν στις χαρακτηριστικές δονήσεις συμμετρικής τάσης (SS) και ασύμμετρης τάσης (AS) του δεσμού Si-O-Si, αντίστοιχα στη δομή της σίλικα^{202,265}.

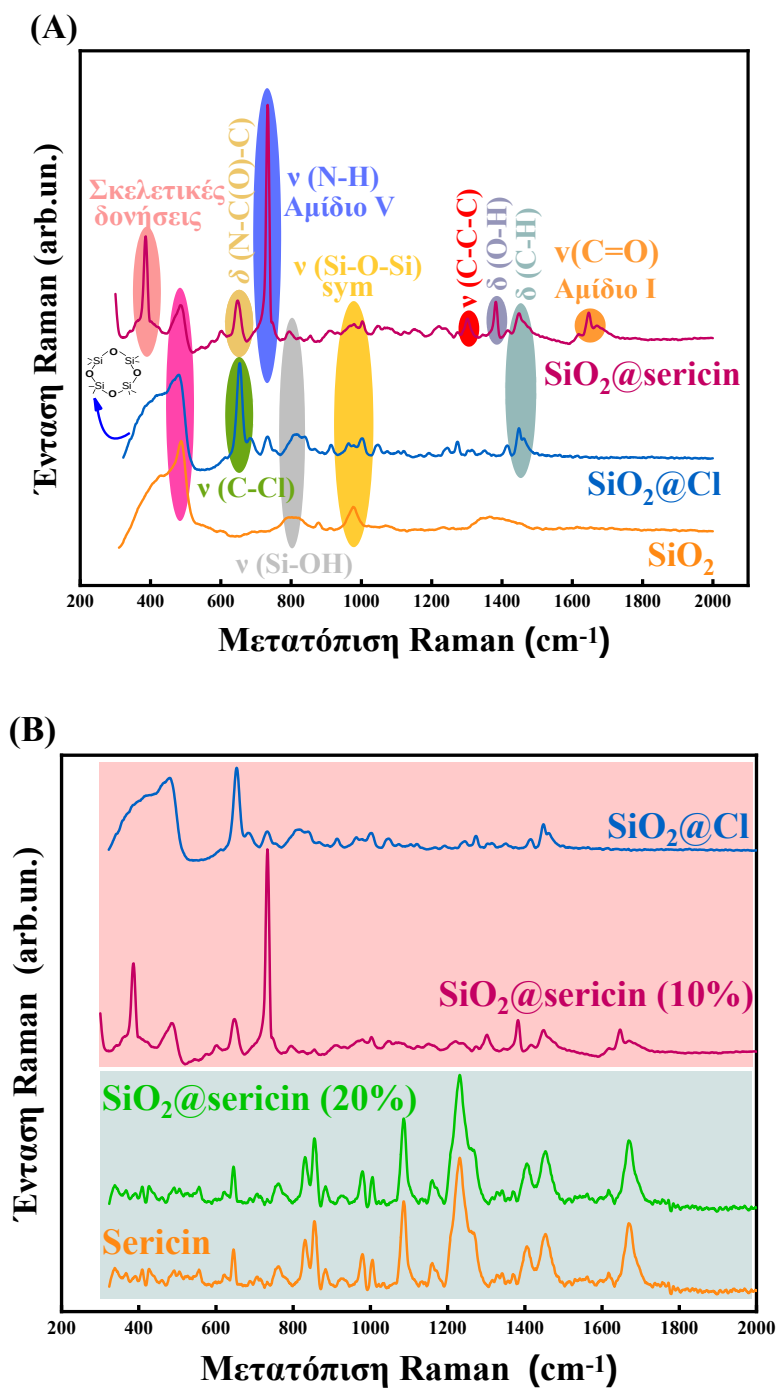
Όπως απεικονίζεται στην **Εικόνα 3-73 Β** το φάσμα FT-IR του υβριδικού υλικού $\text{SiO}_2@\text{sericin}$ (20% φόρτωση της σερικίνης) είναι πανομοιότυπο με εκείνο του υδατικού διαλύματος σερικίνης, υποδεικνύοντας ότι καθώς αυξάνεται το φορτίο της σερικίνης στην επιφάνεια της SiO_2 , οι κορυφές της σίλικα μειώνονται ή καθίστανται μη ανιχνεύσιμες. Το φάσμα FT-IR του υβριδικού υλικού $\text{SiO}_2@\text{sericin}$ (10% φόρτωση της σερικίνης) (**Εικόνα 3-73 Β**) παρουσιάζει χαρακτηριστικές κορυφές που αντιστοιχούν τόσο στη σερικίνη όσο και στη σίλικα, όπως αναλύθηκε λεπτομερώς προηγουμένως. Αυτό δείχνει ότι η φόρτωση 10% σερικίνης στην επιφάνεια της SiO_2 είναι η βέλτιστη, επιτρέποντας τη διατήρηση των ιδιοτήτων που είναι εγγενείς και στα δύο υλικά.

3.5.4.3. Φασματοσκοπία Raman

Στην **Εικόνα 3-74 Α** παρουσιάζονται τα φάσματα Raman για τη SiO₂, το SiO₂@Cl και το υβριδικό υλικό SiO₂@sericin (10%). Στο φάσμα Raman της σίλικα, οι τρόποι δόνησης του δεσμού της σιλοξάνης, συγκεκριμένα οι τρόποι αναπνοής δ(Si-O-Si), παρατηρούνται στην περιοχή 300-600 cm⁻¹. Η ζώνη στα ~480 cm⁻¹ συνδέεται με τον χαρακτηριστικό σχηματισμό τετραμελών δακτυλίων σιλοξάνης (4MRs)¹²⁸. Επιπλέον, η πυριτική μήτρα εμφανίζει μια χαρακτηριστική κορυφή στα 981 cm⁻¹ περίπου, που αντιστοιχεί στη συμμετρική δόνηση τάσης ν(Si-O-Si)²⁹⁸. Η κορυφή που εμφανίζεται στα 796 cm⁻¹ υποδηλώνει την ύπαρξη της ομάδας ν(Si-O-H)¹²⁸.

Το φάσμα Raman του υλικού SiO₂@Cl (μπλε χρώμα) παρουσιάζει όμοια μια αρχική κορυφή στα 480 cm⁻¹, η οποία αποδίδεται στον χαρακτηριστικό σχηματισμό τετραμελών δακτυλίων σιλοξάνης (4MRs)¹²⁸. Η κορυφή που εμφανίζεται στα 657 cm⁻¹ οφείλεται στην ύπαρξη του δεσμού ν(C-Cl)²⁶⁷. Στη συνέχεια, στα 796 και 981 cm⁻¹ παρατηρούνται δύο διακριτές κορυφές, που αντιστοιχούν στις δονήσεις ν(Si-O-H)¹²⁸ και ν(Si-O-Si)²⁹⁸, αντίστοιχα. Τέλος, η κορυφή που παρατηρείται στα 1450 cm⁻¹ αποδίδεται στην δ(C-H) δόνηση κάμψης, η οποία προέρχεται από την παρουσία της ανθρακικής αλυσίδας του πρόδρομου οργανοσιλανίου²⁶⁷.

Το φάσμα Raman της ελεύθερης σερικίνης (πορτοκαλί χρώμα) (**Εικόνα 3-74 Α**). Η κορυφή που παρατηρείται στα 1674 cm⁻¹ αντιστοιχεί στις δονήσεις τάσης του δεσμού ν(C=O), υποδεικνύοντας την παρουσία του Αμιδίου-I. Επιπλέον, οι χαρακτηριστικές κορυφές στην περιοχή 1300-1270 cm⁻¹ που σχετίζονται με Αμίδιο III, οι οποίες καθορίζουν τη δομή α-έλικας, απουσιάζουν από αυτό το φάσμα. Η απουσία αυτή αποδίδεται στη χωρική αταξία της σερικίνης, υποδεικνύοντας την έλλειψη σαφώς καθορισμένης δευτεροταγούς δομής²⁶⁷. Η κορυφή που παρατηρείται στα 1087 cm⁻¹ αποδίδεται στη δόνηση ν(C-O) που σχετίζεται με τους δεσμούς CH₂OH²⁶⁷. Επιπλέον, οι κορυφές στην περιοχή 1008-980 cm⁻¹ αντιστοιχούν σε δονήσεις δεσμών ν(C-C), ενώ εκείνες στην περιοχή 900-800 cm⁻¹ υποδεικνύουν την παρουσία συμμετρικών δονήσεων ν(CNC)²⁶⁵. Η κορυφή που παρατηρείται στα 764 cm⁻¹ αποδίδεται στη δόνηση του δεσμού ν(N-H) του αμιδίου V²⁶⁷.



Εικόνα 3-74. Φάσματα Raman: (A) για σερικίνη (πράσινη γραμμή), υβριδικό υλικό $\text{SiO}_2@\text{sericin}$ (10%) (σκούρα κόκκινη γραμμή), SiO_2 (πορτοκαλί γραμμή) και $\text{SiO}_2@\text{Cl}$ (μπλε γραμμή) και (B) για $\text{SiO}_2@\text{Cl}$ (μπλε γραμμή), το υβριδικό υλικό $\text{SiO}_2@\text{sericin}$ (10%) (σκούρα κόκκινη γραμμή), $\text{SiO}_2@\text{sericin}$ (20%) (καφέ γραμμή) και σερικίνη (πράσινη γραμμή).

Στην **Εικόνα 3-74 Α** παρουσιάζεται επίσης το φάσμα Raman του υβριδικού υλικού SiO₂@sericin (10% φόρτωση). Αυτό το φάσμα αποκαλύπτει επίσης μια κορυφή στα 480 cm⁻¹, η οποία αποδίδεται στον χαρακτηριστικό σχηματισμό τετραμελών δακτυλίων σιλοξάνης (4MRs)²⁶⁷. Η ζώνη που παρατηρείται στα 734 cm⁻¹ αποδίδεται στη δόνηση Αμιδίου V και συγκεκριμένα στις δονήσεις ν(N-H)^{265,267}. Οι κορυφές στα 796 και 981 cm⁻¹ αντιστοιχούν στις δονήσεις ν(Si-O-H)¹²⁸ και ν(Si-O-Si)²⁹⁸, αντίστοιχα. Η κορυφή που εμφανίζεται στα 1302 cm⁻¹ δηλώνει την ύπαρξη του δεσμού ν(C-C-C)²⁶⁵. Επιπλέον, παρατηρούνται κορυφές που σχετίζονται με τις δονήσεις κάμψης δ(O-H) και δ(C-H) στα 1377 και 1451 cm⁻¹, αντίστοιχα²⁶⁷. Τέλος, η κορυφή που παρατηρείται στα 1642 cm⁻¹ αποδίδεται στη δόνηση τετρώματος ν (C=O), η οποία είναι χαρακτηριστική της δόνησης του Αμιδίου I²⁶⁵.

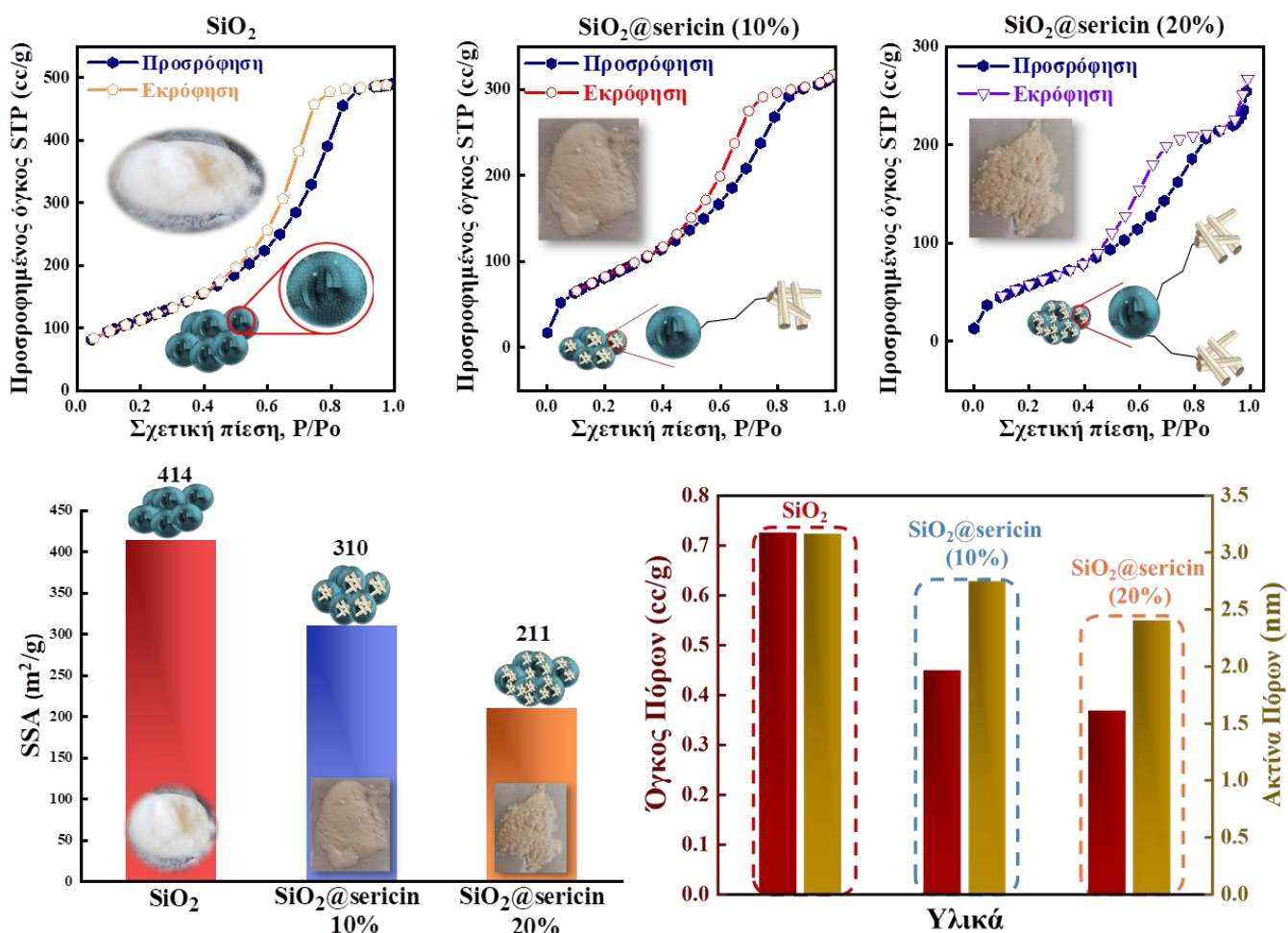
Με βάση τις παραπάνω αναλύσεις, επιβεβαιώνεται περαιτέρω η ακινητοποίηση της σερικίνης στην επιφάνεια της σίλικα.

Στην **Εικόνα 3-74 Β** παρουσιάζονται τα φάσματα Raman για την ελεύθερη σερικίνη, το υβριδικό υλικό SiO₂@sericin (10%), το υβριδικό υλικό SiO₂@sericin (20%) και τη SiO₂. Παρόμοια με τις παρατηρήσεις στη φασματοσκοπία FT-IR, η φασματοσκοπία Raman αποκαλύπτει ότι το φάσμα του υβριδικού υλικού SiO₂@sericin (20% φόρτιση σερικίνης) είναι πανομοιότυπο με αυτό της σερικίνης, υποδεικνύοντας ότι καθώς αυξάνεται το οργανικό φορτίο στην επιφάνεια της σίλικα, το φάσμα του υβριδικού υλικού ευθυγραμμίζεται προοδευτικά με αυτό του υδατικού διαλύματος σερικίνης. Αντίθετα, το φάσμα Raman του υβριδικού υλικού SiO₂@sericin (10% φόρτιση σερικίνης) παρουσιάζει κορυφές που αντιστοιχούν τόσο στη σερικίνη όσο και στη σίλικα.

3.5.4.4. BET ανάλυση.

Η ακινητοποίηση της επιφάνειας των σωματιδίων της σίλικα (SiO₂) από την σερικίνη αποδεικνύεται αρχικά μέσω των παρατηρήσιμων χρωματικών αλλαγών στα αρχικά λευκά σωματίδια SiO₂, τα οποία μεταβαίνουν σε λευκό-κίτρινο για το υβριδικό υλικό SiO₂@sericin (10%) και αχνό-κίτρινο για το υβριδικό υλικό SiO₂@sericin (20%). Αυτό υποδηλώνει επιτυχή τροποποίηση των επιφανειών σωματιδίων **Εικόνα 3-75**. Η αξιολόγηση της ειδικής επιφάνειας

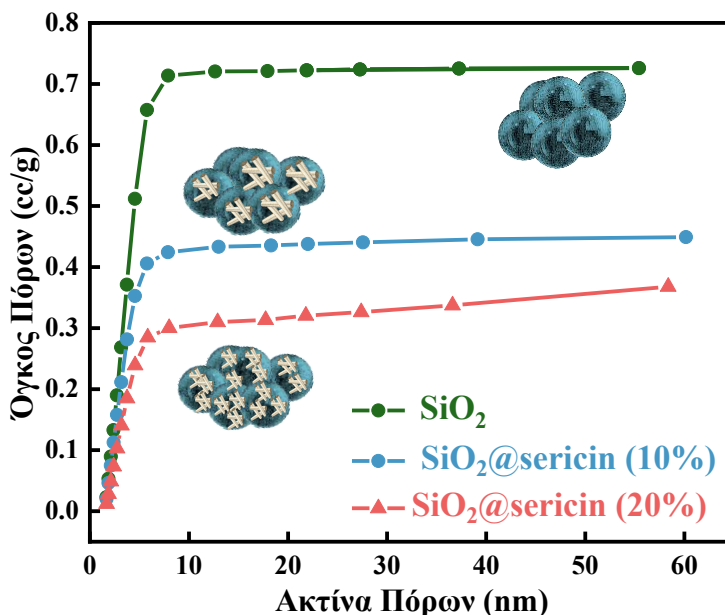
(SSA, m^2/g) των υλικών παρέχει κρίσιμες πληροφορίες για την επιφανειακή χημεία τους και διευκρινίζει την επίδραση της ακινητοποίησης της σερίκνης στην επιφάνεια της σύλικα.



Εικόνα 3-75. Ειδικές επιφάνειες (SSA) (m^2/g) της SiO_2 , του υβριδικού υλικού $\text{SiO}_2@\text{sericin}$ (10% φόρτωση) και του υβριδικού υλικού $\text{SiO}_2@\text{sericin}$ (20% φόρτωση). Το μπαρόγραμμα (κάτω αριστερά) απεικονίζει τις ειδικές επιφάνειες των προαναφερθέντων υλικών. Παρατηρείται ότι η αύξηση του οργανικού φορτίου αντιστοιχεί σε προοδευτική μείωση της ειδικής επιφάνειας του υλικού. Το ίδιο φαινόμενο παρατηρήθηκε και στο μπαρόγραμμα του όγκου των πόρων και της ακτίνας των πόρων (κάτω δεξιά.)

Όπως προκύπτει από τις ισόθερμες προσρόφησης-εκρόφησης, και τα τρία υλικά παρουσιάζουν ισόθερμες τύπου IV, χαρακτηριστικές των μεσοπορωδών δομών. Επιπλέον, το μπαρόγραμμα της ειδικής επιφάνειας (Εικόνα 3-75 κάτω αριστερά) αποκαλύπτει ότι ο επιφανειακή ακινητοποίηση οδηγεί σε μείωση της ειδικής επιφάνειας από 414 m^2/g στα απλά

σωματίδια σίλικα σε 310 m²/g στο υβριδικό υλικό SiO₂@sericin (με 10% σερικίνη) και 211 m²/g στο υβριδικό υλικό SiO₂@sericin (με 20% σερικίνη). Η ακινητοποίηση της σερικίνης σε ποσοστό 20% στην επιφάνεια της σίλικα οδηγεί σε μείωση της ειδικής επιφάνειας του υλικού κατά 50% σε σύγκριση με τη εμπορική σίλικα. Παρόμοια τάση παρατηρείται στον όγκο και την ακτίνα των πόρων (Εικόνα 3-75 κάτω δεξιά) (Εικόνα 3-76), όπου η αύξηση του οργανικού φορτίου στην επιφάνεια της σίλικα οδηγεί σε αντίστοιχη μείωση και των δύο παραμέτρων.



Εικόνα 3-76. Ανάλυση μεγέθους πόρων για τα υλικά SiO₂, SiO₂@sericin (10%) και SiO₂@sericin (20%).

3.5.4.5. Μελέτη κατανομής μεγέθους (DLS) και Δυναμικό ζήτα.

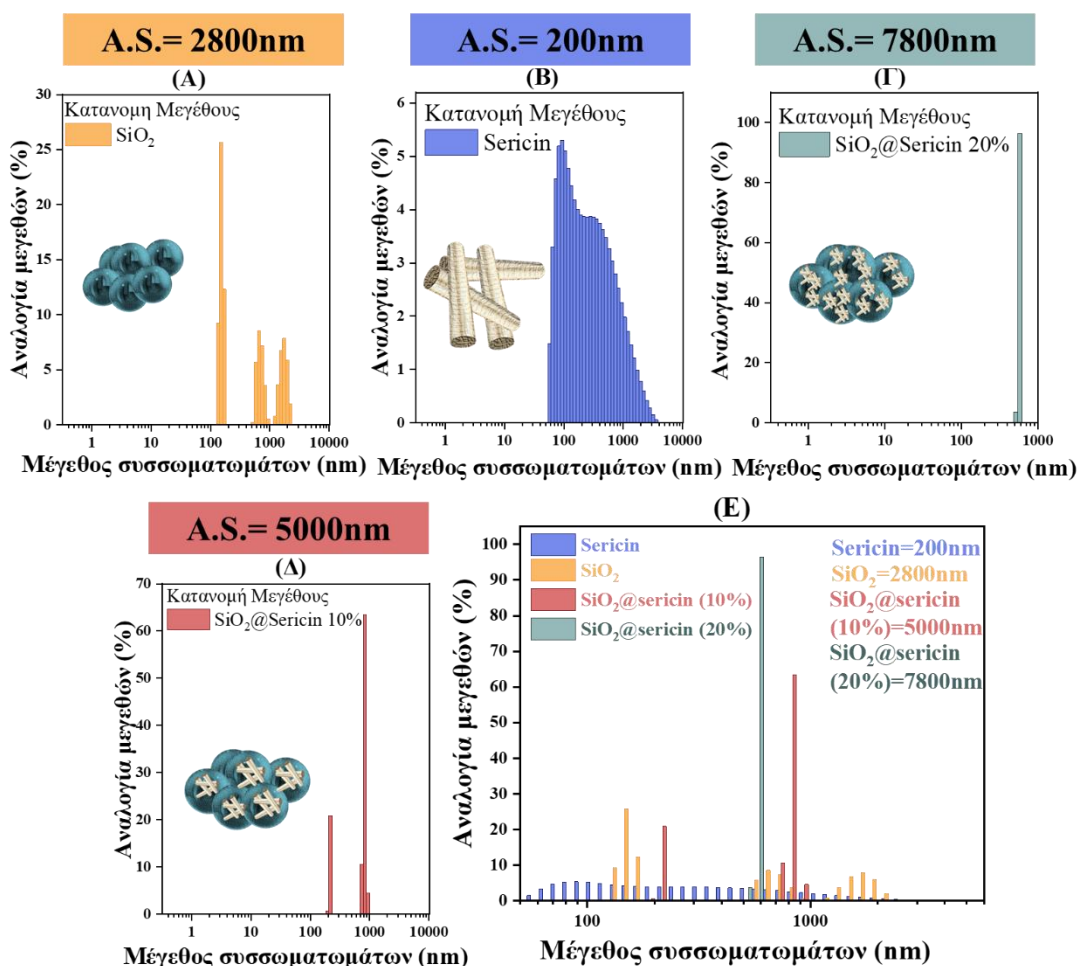
Ο προσδιορισμός του μεγέθους των σωματιδίων και του επιφανειακού φορτίου είναι απαραίτητος για τον κατάλληλο χαρακτηρισμό των σωματιδίων και η Δυναμική Σκέδαση Φωτός (DLS) μαζί με το δυναμικό ζήτα (ZP) είναι από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μετρήσεις για τον προσδιορισμό αυτών των χαρακτηριστικών.

DLS (Δυναμική Σκέδαση Φωτός).

Για τις μετρήσεις μεγέθους DLS, τα δείγματα υπέστησαν επεξεργασία σε υπερήχους για 15 λεπτά και διασκορπίστηκαν απευθείας σε 3mL απιονισμένου H₂O στην κυψελίδα. Η μάζα του δείγματος που απαιτείται για κάθε μέτρηση είναι η ακόλουθη: υδατικό διάλυμα σερικίνης 195.4 mg, SiO₂ 9mg, SiO₂@sericin (10%) και SiO₂@sericin (20%) 1mg.

Η σίλικα παρουσιάζει τρεις διακριτές κατανομές μεγέθους σωματιδίων d στα 156 ± 25 nm (25%), 669 ± 300 nm (8%) και 1785 ± 630 nm (7.33%), που υποδηλώνουν μια τάση πολυδιασποράς της σίλικα (**Εικόνα 3-77 A**). Ωστόσο, ένα σαφές παράδειγμα πολυδιασποράς παρατηρείται στο υδατικό διάλυμα της σερικίνης (**Εικόνα 3-77 B**), στο οποίο παρατηρείται μια ευρεία κατανομή μεγέθους, που κυμαίνεται από 57 (1.45%) έως 4036 (0.03%) nm. Μια τέτοια κατανομή υποδηλώνει υψηλό βαθμό διακύμανσης μεγέθους εντός του πληθυσμού των σωματιδίων. Σε αντίθεση με τα παραπάνω, οι κατανομές μεγέθους των συντιθέμενων υβριδικών υλικών διαφέρουν σημαντικά.

Το υλικό SiO₂@sericin (20%) (**Εικόνα 3-77 Γ**) παρουσιάζει δύο διακριτές κατανομές μεγέθους, στα 512 (3.7%) και 585 (96.2%) nm, ενώ το υλικό SiO₂@sericin (10%) (**Εικόνα 3-77 Δ**) παρουσιάζει πέντε διακριτές κατανομές μεγέθους: 189 (0.44%), 212 (20.7%), 739 (10.4%), 854 (63%) και 943 (4.4%) nm. Και τα δύο υβριδικά υλικά παρουσιάζουν μια κατανομή μεγέθους που εμφανίζεται σε πολύ υψηλότερη συχνότητα από οποιανδήποτε κατανομή στη SiO₂ ή τη σερικίνη: κατανομή των 585 nm σε ποσοστό συχνότητας 96.2% και κατανομή των 854 nm σε ποσοστό συχνότητας 63% για τα υβριδικά υλικά SiO₂@sericin (20%) και SiO₂@sericin (10%) αντίστοιχα. Έτσι, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι οι πληθυσμοί σωματιδίων των συντιθέμενων υβριδικών υλικών μπορούν να θεωρηθούν μονοδιάσπαρτοι, ιδίως σε σύγκριση με τη SiO₂ και τη σερικίνη. Υπολογίστηκε επίσης και η μέση διάμετρος των σωματιδίων (Particle Size): SiO₂ (2800 nm), υδατικό διάλυμα σερικίνης (200 nm), υβριδικό SiO₂@sericin (20%) (7800 nm) και υβριδικό SiO₂@sericin (10%) (5000 nm). Η **Εικόνα 3-77 E** παρέχει μια λεπτομερή γραφική αναπαράσταση του των κατανομών μεγέθους και των μεγεθών σωματιδίων για όλα τα υλικά.



Εικόνα 3-77. Οι κατανομές μεγέθους των υλικών παρουσιάζονται ως εξής: (Α) SiO₂, (Β) υδατικό διάλυμα σερικίνης, (Γ) SiO₂@sericin (20%) και (Δ) SiO₂@sericin (10%). (Ε) Αντιπροσωπεύει τις κατανομές μεγέθους των συσσωματωμάτων που σχηματίζονται από όλα τα υλικά.

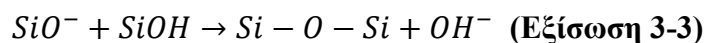
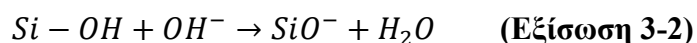
Δυναμικό ζ.

Για τις μετρήσεις του δυναμικού ζήτα, πραγματοποιήσαμε τιτλοδοτήσεις από όξινες σε βασικές τιμές pH και συγκεκριμένα, από pH 2 έως pH 9 χρησιμοποιώντας 0.1M HNO₃ και 0.1M NaOH για τη ρύθμιση του pH. Κάθε ένα από τα δείγματα τοποθετήθηκε σε υπερήχους για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια διασκορπίστηκε σε 100mL απιονισμένου H₂O. Τα δείγματα που μετρήθηκαν είναι: SiO₂, υδατικό διάλυμα σερικίνης, SiO₂@sericin (10% φόρτωση σερικίνης), SiO₂@sericin (20% φόρτωση σερικίνης), και η μάζα του δείγματος που απαιτείται για κάθε τιτλοδότηση, αντίστοιχα, 300mg, 10mg, 33,3mg και 35,2 mg. Τα διαλύματα

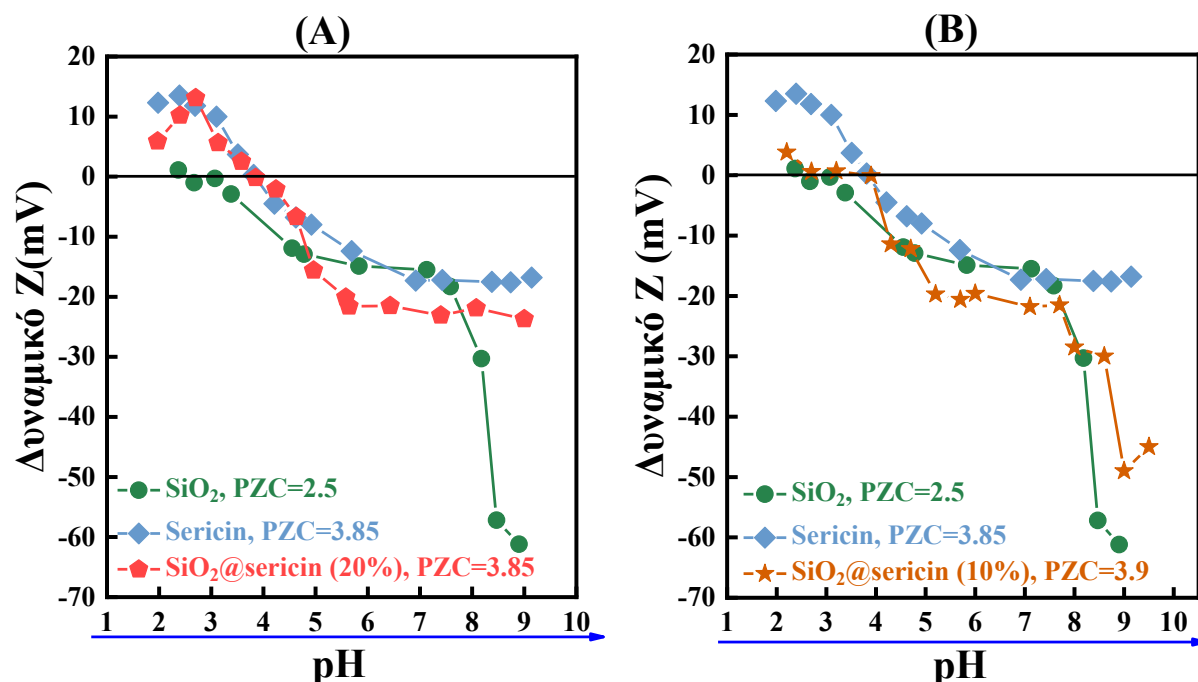
αφέθηκαν σε ηρεμία στην αρχική τιμή pH (pH 2) για 15 λεπτά υπό ήπιες συνθήκες ανάδευσης για τη σταθεροποίηση του pH και στη συνέχεια άρχισε η τιτλοδότηση.

Στην **Εικόνα 3-78** παρουσιάζονται οι μετρήσεις του δυναμικού ζήτα των τεσσάρων διαφορετικών υλικών: SiO₂, υδατικό διάλυμα σερικίνης και υβριδικά υλικά SiO₂@sericin με διαφορετικά ποσοστά σερικίνης στην επιφάνεια της σίλικα (10 και 20%). Η σερικίνη παρουσίασε σημείο μηδενικού φορτίου (PZC) ≈ 4 και η τιμή αυτή κυμαίνεται γύρω στο pH = 4.0 – 5.0, ανάλογα με την καθαρότητα των αμινοξέων του υλικού. Σε pH < PZC, η σερικίνη εμφανίζει θετικές τιμές του δυναμικού ζήτα λόγω της πρωτονίωσης των αμινομάδων (-NH₃⁺), ενώ σε pH > PZC το δυναμικό ζήτα είναι αρνητικό λόγω της αποπρωτονίωσης των καρβοξυλικών ομάδων (-COO⁻)^{299,300}.

Όσον αφορά τη SiO₂, η επιφάνειά της αποτελείται από ομάδες σιλανολών (Si-OH) και παρουσιάζει PZC ≈ 2.5 , τιμή πολύ χαμηλότερη από την PZC των οξειδίων μετάλλων (π.χ. TiO₂). Αυτό σημαίνει ότι μόνο σε πολύ χαμηλό pH (<2.5) οι ομάδες Si-OH παραμένουν πρωτονιωμένες ως Si-OH₂⁺, γεγονός που θα μπορούσε να δώσει θετικό φορτίο και, επομένως, θετικό δυναμικό Ζήτα. Ωστόσο, η SiO₂ διαλύεται σε πολύ χαμηλό pH, καθιστώντας δύσκολη την παρατήρηση σταθερών, θετικά φορτισμένων αιωρημάτων SiO₂. Η συμπίκνωση των ομάδων σιλανόλης (Si-OH) περιγράφεται από τις ακόλουθες εξισώσεις (**Εξισώσεις 3-2, 3-3**)^{301,302}:



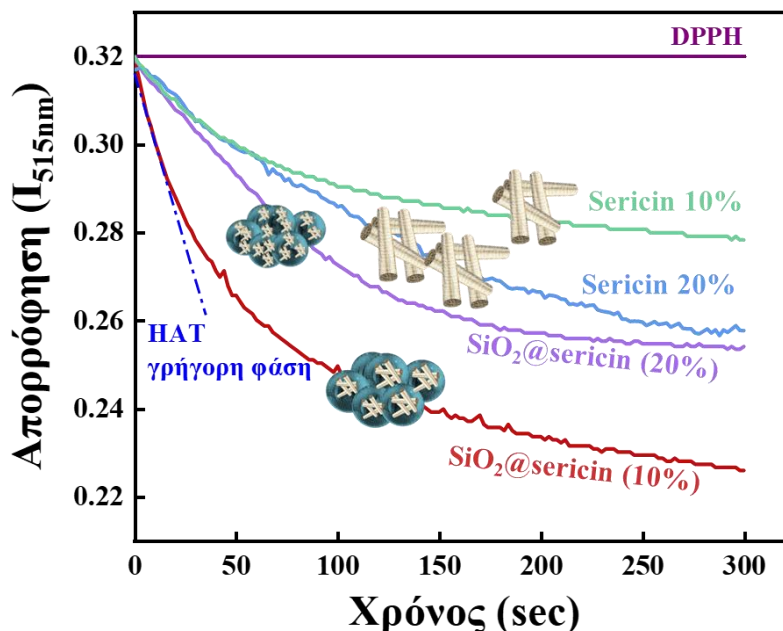
Οι τιμές του δυναμικού ζήτα του υβριδικού υλικού SiO₂@sericin (20% φόρτωση σερικίνης) παρουσιάζουν ένα προφίλ που μοιάζει πολύ με αυτό του υδατικού διαλύματος σερικίνης (**Εικόνα 3-78 A**), όπως αποδεικνύεται από την εμφάνιση της ίδιας τιμής PZC και των γενικά πανομοιότυπων τιμών του δυναμικού ζήτα στην όξινη περιοχή pH= 2 έως pH= 4. Αντίθετα, το υβριδικό υλικό SiO₂@sericin (10% φόρτωση σερικίνης) εμφανίζει προφίλ σχεδόν πανομοιότυπο με εκείνο της σίλικα (SiO₂), όπως υποδηλώνουν οι αρνητικές τιμές του δυναμικού ζήτα (**Εικόνα 3-78 B**). Η παρατήρηση αυτή υποδεικνύει ότι καθώς αυξάνεται το οργανικό φορτίο στην επιφάνεια της σίλικα, το υβριδικό υλικό μοιάζει προοδευτικά με το υδατικό διάλυμα σερικίνης, παρουσιάζοντας χαρακτηριστικά που μοιάζουν περισσότερο με τη σερικίνη παρά με τη σίλικα.



Εικόνα 3-78. Το δυναμικό ζήτα (ζ , mV) όλων των υλικών σε συνάρτηση με το pH, από όξινες έως αλκαλικές συνθήκες.

3.5.5. Αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης των υβριδικών υλικών έναντι των ριζών DPPH.

Η μέθοδος DPPH χρησιμοποιήθηκε για τη διερεύνηση της αντιοξειδωτικής δράσης της σερικίνης (υδατικό διάλυμα 10%), της σερικίνης (υδατικό διάλυμα 20%), του υβριδικού υλικού SiO₂@sericin (20%) και του υβριδικού υλικού SiO₂@sericin (10%), χρησιμοποιώντας διάφορες συγκεντρώσεις μεθανολικών διαλυμάτων τους που εισήχθησαν in situ στο διάλυμα DPPH/MeOH χρησιμοποιώντας UV-Vis. Στη συνέχεια παρακολουθούνται συνεχώς οι χρονικά εξαρτώμενες μεταβολές της απορρόφησης DPPH στα 515 nm. Η **Εικόνα 3-79** απεικονίζει την αντιοξειδωτική δράση των υλικών της σερικίνης έναντι των ριζών DPPH και εκεί το υβριδικό υλικό SiO₂@sericin (10%) παρουσιάζει την υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση μεταξύ των τεσσάρων δειγμάτων. Ειδικότερα, όταν η σερικίνη απομονώνεται και ακινητοποιείται στην επιφάνεια της σίλικα, η αντιοξειδωτική της δράση ενισχύεται περαιτέρω, συγκεκριμένα παρατηρείται να αυξάνεται κατά δύο ή τρεις φορές.



Εικόνα 3-79. Κινητική της αντιοξειδωτικής δράσης HAT της σερικίνης (υδατικό διάλυμα 10%), της σερικίνης (υδατικό διάλυμα 20%) και των υβριδικών υλικών SiO₂@sericin (10%) και SiO₂@sericin (20%) που πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο DPPH.

Όπως απεικονίζεται στην **Εικόνα 3-79**, μεταξύ των υβριδικών υλικών SiO₂@sericin, το υβριδικό υλικό που περιέχει 10% σερικίνη παρουσιάζει την υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση. Είναι ενδιαφέρον ότι, καθώς η περιεκτικότητα σε σερικίνη στην επιφάνεια της σύλικα αυξάνεται στο 20%, η αντιοξειδωτική δραστηριότητα του υβριδικού υλικού μειώνεται, προσεγγίζοντας το επίπεδο αντιοξειδωτικής δραστηριότητας της καθαρής σερικίνης σε υδατικό διάλυμα 20%. Κατά συνέπεια, τα υλικά μπορούν να καταταγούν κατά αύξουσα σειρά αντιοξειδωτικής δραστηριότητας ως εξής: SiO₂@sericin (10%) > SiO₂@sericin (20%) > σερικίνη (υδατικό διάλυμα 20%) > σερικίνη (υδατικό διάλυμα 10%).

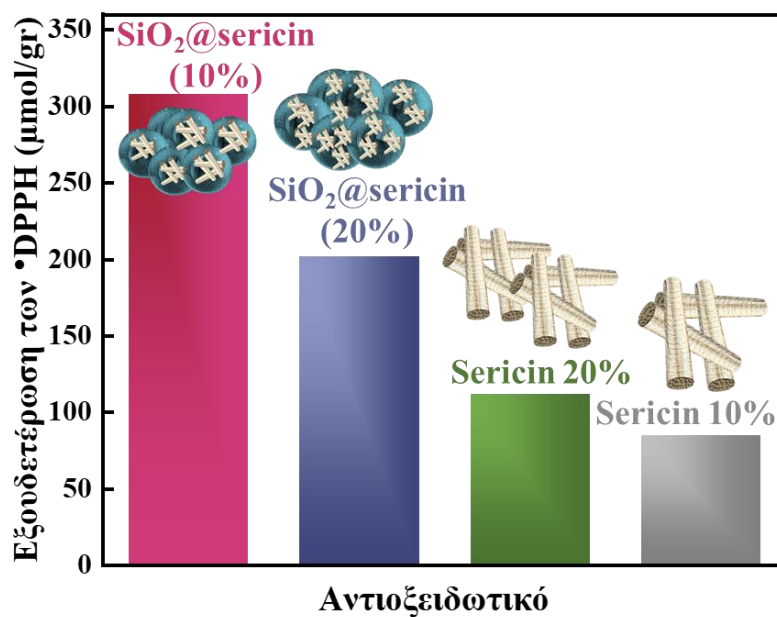
Όπως απεικονίζεται στην **Εικόνα 3-79** (μπλε διακεκομμένη γραμμή), η σερικίνη και τα υβριδικά υλικά της εξουδετερώνουν τις ρίζες DPPH μέσω του μηχανισμού μεταφοράς ατόμων υδρογόνου (HAT) ⁷⁹. Στον μηχανισμό μεταφοράς ατόμων υδρογόνου (HAT), τόσο το πρωτόνιο όσο και το ηλεκτρόνιο μεταφέρονται ταυτόχρονα από τον ίδιο δότη στον δέκτη ⁸⁴. Η ποσοτικοποίηση των ριζών DPPH που εξουδετερώνονται από τη σερικίνη και τα υβριδικά υλικά της θα πραγματοποιείται με χρήση του νόμου Lambert-Beer (**Εξίσωση 3-1**) ²⁷¹.

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad \text{Εξίσωση (3-1)}$$

όπως έχει αναλυθεί εκτενώς στην Ενότητα 3.2.1.

Χρησιμοποιώντας την εξίσωση Lambert-Beer, υπολογίστηκαν τα μmol ριζών DPPH που εξουδετερώνονται ανά γραμμάριο υλικού. Η **Εικόνα 3-80** δείχνει ότι 1 gr υβριδικού υλικού $\text{SiO}_2@\text{sericin}$ (10% φόρτωση) εξουδετερώνει 308 μmol ριζών DPPH, 1 gr υβριδικού υλικού $\text{SiO}_2@\text{sericin}$ (20% φόρτωση) εξουδετερώνει 202 μmol ριζών DPPH, 1 gr υδατικού διαλύματος της σερικίνης 20% εξουδετερώνει 112 μmol ριζών DPPH και 1 gr υδατικού διαλύματος της σερικίνης 10% εξουδετερώνει 85 μmol ριζών DPPH (**Πίνακας 3-7**).

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η ακινητοποίηση της σερικίνης στην επιφάνεια της σίλικα ενισχύει την αντιοξειδωτική δράση του υβριδικού υλικού. Επισημαίνεται επίσης ότι καθώς αυξάνεται το ποσοστό της σερικίνης στην επιφάνεια της σίλικα, η αντιοξειδωτική δράση του υβριδικού υλικού προσεγγίζει εκείνη του υδατικού διαλύματος σερικίνης.



Εικόνα 3-80. Απεικόνιση με ραβδογράμματα που απεικονίζει του αριθμού των μmol των ριζών DPPH που εξουδετερώνονται ανά γραμμάριο δείγματος.

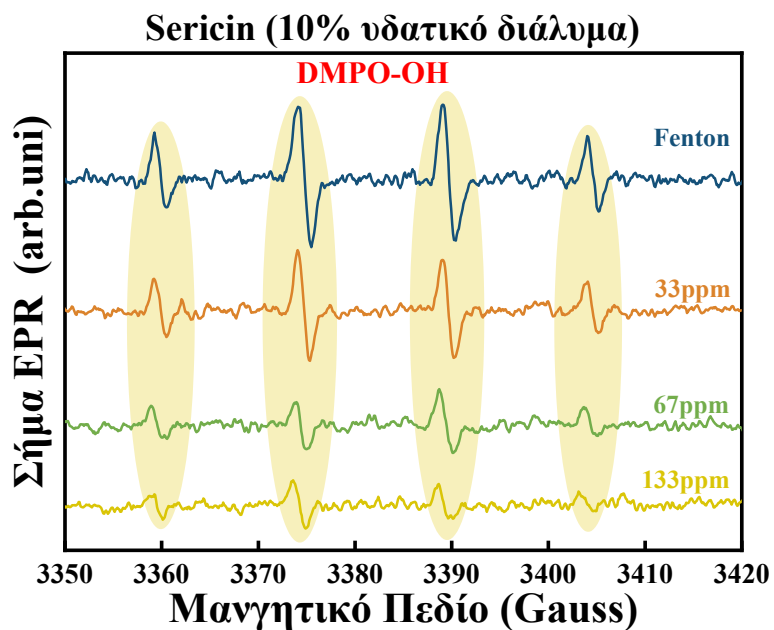
Πίνακας 3-7. Ικανότητα εξουδετέρωσης ριζών DPPH (μmol) ανά γραμμάριο αντιοξειδωτικού δείγματος.

Αντιοξειδωτικό (33ppm)	Εξουδετέρωση ριζών DPPH ($\mu\text{mol}/$ γραμμάριο δείγματος) (± 0.01)
Σερικίνη (υδατικό διάλυμα 10%)	85
Σερικίνη (υδατικό διάλυμα 20%)	112
$\text{SiO}_2@\text{sericin}$ (20%)	202
$\text{SiO}_2@\text{sericin}$ (10%)	308

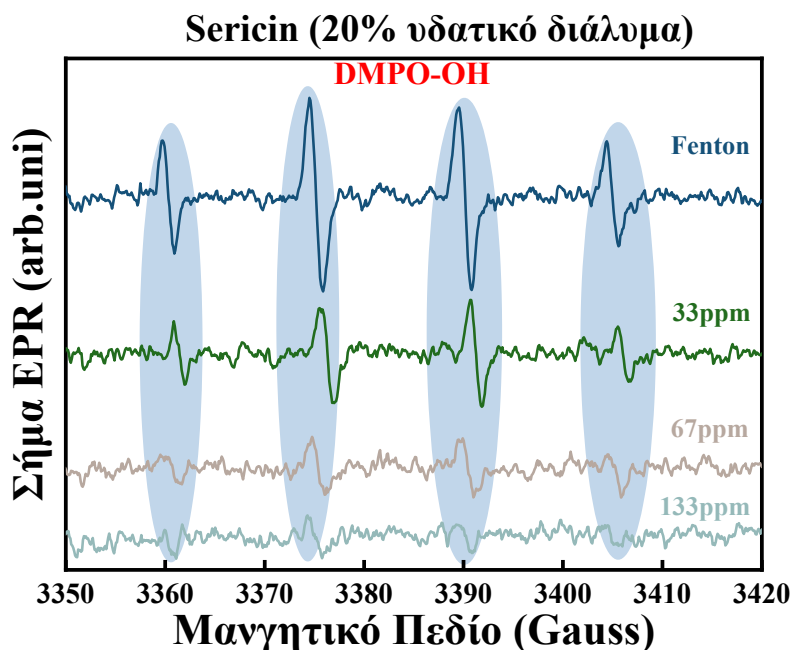
3.5.6. Αξιολόγηση της ικανότητας αλληλεπίδρασης των υλικών σερικίνης με ρίζες υδροξυλίου ($\bullet\text{OH}$)

Το διάλυμα που περιέχει ρίζες DMPO-OH εμφανίζει ένα χαρακτηριστικό φάσμα EPR τεσσάρων γραμμών με εντάσεις 1:2:2:1^{280–283}. Η παρουσία αντιοξειδωτικών έχει ως αποτέλεσμα την απόσβεση των ριζών υδροξυλίου ($\bullet\text{OH}$), η οποία υποδεικνύεται από τη μείωση της έντασης των κορυφών στα φάσματα EPR όπως παρουσιάστηκε και στα προηγούμενα κεφάλαια. Στα πειράματα εδώ δεν ανιχνεύθηκαν πρόσθετες ή δευτερογενείς ρίζες.

Η αρχική έρευνα επικεντρώθηκε στην αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης υδατικού διαλύματος της πρωτεΐνης σερικίνης. Εφαρμόστηκε το πειραματικό πρωτόκολλο που περιγράφεται στην Ενότητα 3.3.3.1. Υδατικό διάλυμα σερικίνης 10% (**Εικόνα 3-81**) 20% κ.β. (**Εικόνα 3-82**) εισήχθη στο μίγμα της αντίδρασης Fenton μετά από 30 sec εξέλιξής της σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, C=33ppm, C=67ppm και C=133ppm. Οι **Εικόνα 3-81** και **Εικόνα 3-82** παρέχουν μια σχηματική αναπαράσταση της δημιουργίας των ριζών DMPO-OH, λόγω $\bullet\text{OH}$ παρουσία σερικίνης στο διάλυμα.



Εικόνα 3-81. Φάσμα EPR, που απεικονίζει τη μείωση της συγκέντρωσης των ριζών υδροξυλίου ($\bullet\text{OH}$) παρουσία υδατικού διαλύματος σερίκνης 10% κ.β.

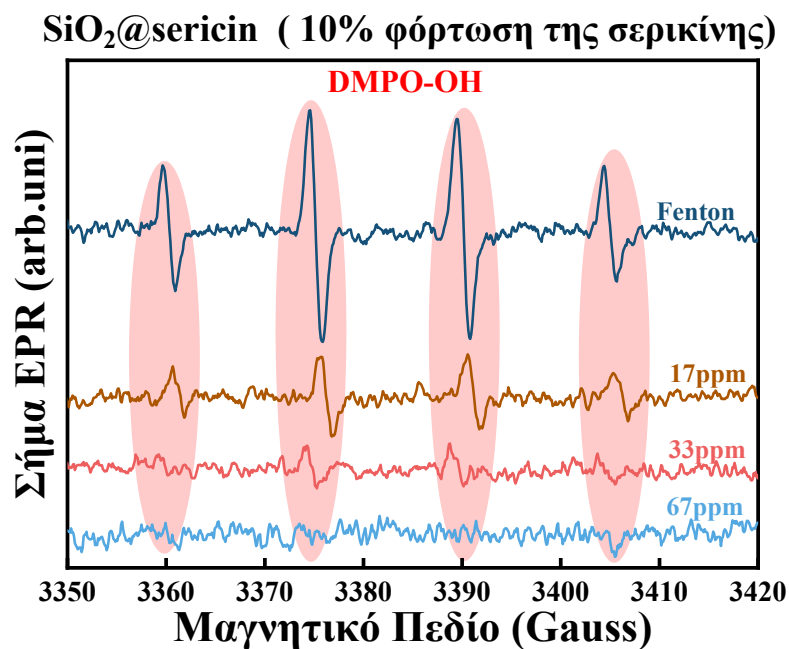


Εικόνα 3-82. Φάσμα EPR, που απεικονίζει τη μείωση της συγκέντρωσης των ριζών υδροξυλίου ($\bullet\text{OH}$) παρουσία υδατικού διαλύματος σερίκνης 20% κ.β.

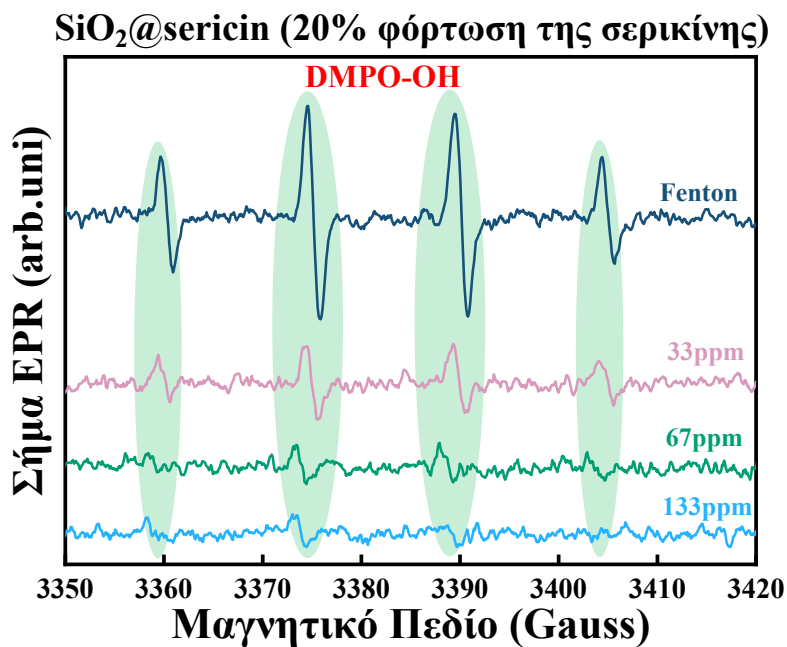
Όπως φαίνεται στις **Εικόνα 3-81** και **Εικόνα 3-82** η προσθήκη του υδατικού διαλύματος σερικίνης μειώνει σημαντικά τη συγκέντρωση των ριζών OH στο διάλυμα. Σε συγκέντρωση 33 ppm, 1 γραμμάριο υδατικού διαλύματος της σερικίνης 10% κ.β. απομακρύνει 53 μmol ριζών υδροξυλίου ($\bullet\text{OH}$) και 1 γραμμάριο υδατικού διαλύματος της σερικίνης 20% κ.β απομακρύνει 70 μmol ριζών υδροξυλίου ($\bullet\text{OH}$) (**Πίνακας 3-8**).

Στη συνέχεια αξιολογήθηκε η αντιοξειδωτική δράση του υβριδικού υλικού $\text{SiO}_2@\text{sericin}$ (με φόρτιση 10%) έναντι των ριζών υδροξυλίου ($\bullet\text{OH}$). Η αξιολόγηση πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται στην Ενότητα 3.3.3.1. Υδατικό εναιώρημα του υβριδικού υλικού $\text{SiO}_2@\text{sericin}$ (10% φόρτωση) (**Εικόνα 3-83**) εισήχθη στο διάλυμα Fenton σε διάφορες συγκεντρώσεις, C=17ppm, C=33ppm και C=67ppm. Η **Εικόνα 3-83** απεικονίζει τα φάσματα EPR ριζών DMPO-OH για διάφορες συγκεντρώσεις σερικίνης με χρήση υβριδικού υλικού $\text{SiO}_2@\text{sericin}$ (10%). Η παρατηρούμενη μείωση της συγκέντρωσης των ριζών υδροξυλίου ($\bullet\text{OH}$) υποδηλώνει την αποτελεσματικότητα των υβριδικών υλικών στην εξουδετέρωσή τους, καθώς υπολογίζεται ότι 1 γραμμάριο $\text{SiO}_2@\text{sericin}$ (10% φόρτωση) εξουδετερώνει 120 μmol ριζών υδροξυλίου ($\bullet\text{OH}$) (**Πίνακας 3-8**).

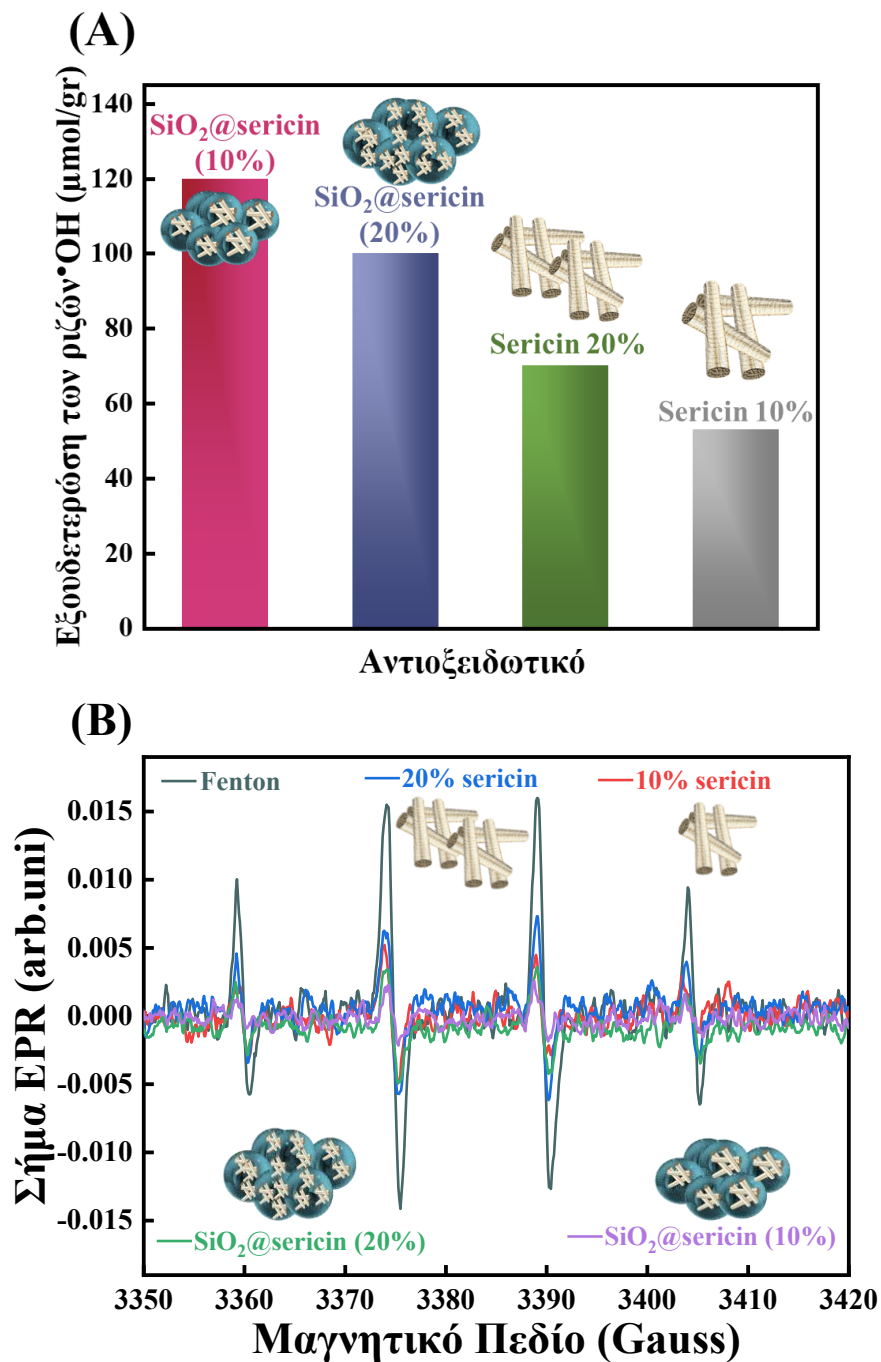
Πραγματοποιήθηκε μελέτη για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης του υβριδικού υλικού $\text{SiO}_2@\text{sericin}$ (20% φόρτωση), στοχεύοντας στην διερεύνηση της αποτελεσματικότητάς του έναντι των ριζών υδροξυλίου ($\bullet\text{OH}$). Η αξιολόγηση πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται στην Ενότητα 3.3.3.1. Όπως και σε προηγούμενα πειράματα, στο διάλυμα Fenton προστέθηκαν ποικίλες συγκεντρώσεις σερικίνης με χρήση του υβριδικού υλικού $\text{SiO}_2@\text{sericin}$ (20% φόρτωση) και συγκεκριμένα 33 ppm, 67 ppm και 133 ppm. Στην **Εικόνα 3-84** παρουσιάζεται το φάσμα EPR του υβριδικού υλικού $\text{SiO}_2@\text{sericin}$ (20% φόρτιση), το οποίο απεικονίζει την αλληλεπίδρασή του με τις ρίζες OH. Η ποσοτικοποίηση των εναπομείναντων ριζών OH έδειξε ότι 1 γραμμάριο του υβριδικού υλικού $\text{SiO}_2@\text{sericin}$ (20% φόρτωση) μπορεί να εξουδετερώσει 100 μmol ριζών υδροξυλίου ($\bullet\text{OH}$) (**Πίνακας 3-8**).



Εικόνα 3-83. Το φάσμα EPR παρουσία του υβριδικού υλικού SiO₂@sericin (10% φόρτωση) υποδεικνύει σημαντική μείωση της συγκέντρωσης των ριζών υδροξυλίου ($\bullet$ OH).



Εικόνα 3-84. Το φάσμα EPR παρουσία του υβριδικού υλικού SiO₂@sericin (20% φόρτωση) υποδεικνύει σημαντική μείωση της συγκέντρωσης των ριζών υδροξυλίου ($\bullet$ OH).



Εικόνα 3-85. (A) μmoles ριζών υδροξυλίου ($\bullet\text{OH}$) που εξουδετερώθηκαν ανά γραμμάριο αντιοξειδωτικού δείγματος και (B) φάσματα ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού (EPR) για όλα τα υλικά.

Με βάση τα δεδομένα που παρουσιάζονται **Πίνακας 3-8** και την **Εικόνα 3-85**, το υβριδικό υλικό SiO₂@sericin (10% φόρτωση σερικίνης) παρουσιάζει την υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση

έναντι των ριζών υδροξυλίου ($\bullet\text{OH}$). Τα αποτελέσματα δείχνουν επίσης ότι η ακινητοποίηση της σερικίνης στην επιφάνεια της σίλικα ενισχύει την ικανότητα της σερικίνης να εξουδετερώνει τις ρίζες $\bullet\text{OH}$. Αύξηση της ποσότητας της σερικίνης στην επιφάνεια της σίλικα έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της ικανότητας απόσβεσης ριζών υδροξυλίου ($\bullet\text{OH}$)- ωστόσο, η ικανότητα αυτή παραμένει υψηλότερη σε σύγκριση με εκείνη του υδατικού διαλύματος σερικίνης ίδιας περιεκτικότητας κ.β.

Πίνακας 3-8. Ικανότητα εξουδετέρωσης ριζών υδροξυλίου ($\bullet\text{OH}$) (μmol) ανά γραμμάριο αντιοξειδωτικού.

Αντιοξειδωτικό (33ppm)	Εξουδετέρωση OH ριζών (μmol / γραμμάριο δείγματος)
Σερικίνη (υδατικό διάλυμα 10%)	53
Σερικίνη (υδατικό διάλυμα 20%)	70
$\text{SiO}_2@\text{sericin}$ (20%)	100
$\text{SiO}_2@\text{sericin}$ (10%)	120

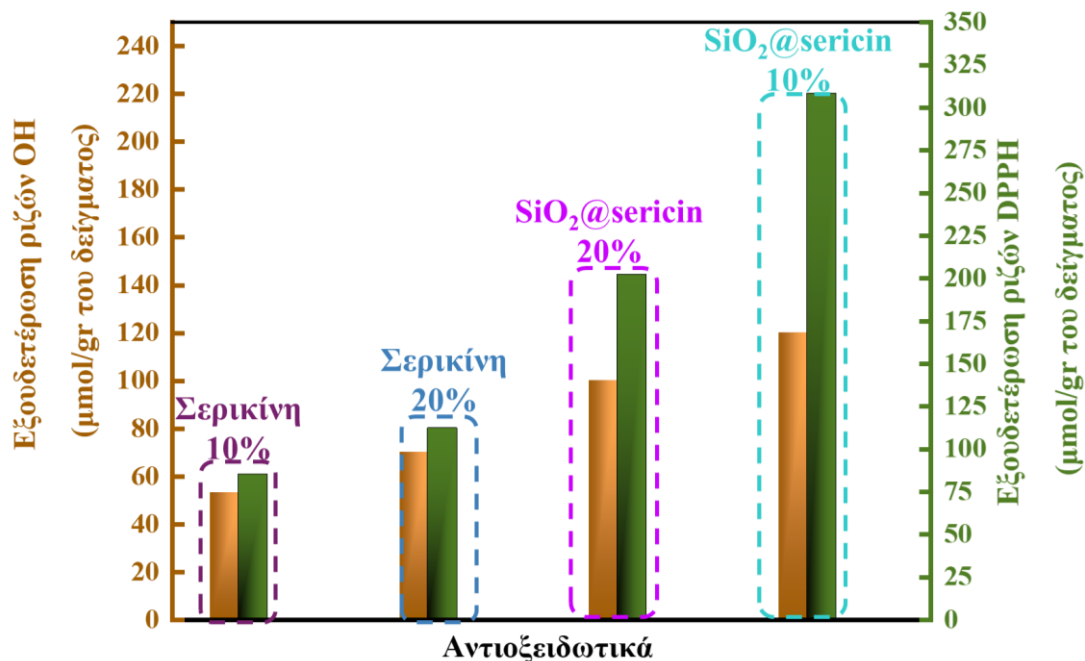
3.5.7. Συγκριτική ανάλυση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των υλικών σερικίνης έναντι ριζών υδροξυλίου και DPPH.

Ο Πίνακας 3-9 παρουσιάζει συγκριτική ανάλυση των υδατικών διαλυμάτων σερικίνης και των υβριδικών υλικών σερικίνης ($\text{SiO}_2@\text{sericin}$ 10%, $\text{SiO}_2@\text{sericin}$ 20%), όσον αφορά την ικανότητά τους να εξουδετερώνουν τις ρίζες DPPH και τις ρίζες υδροξυλίου. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι τόσο για τις $\bullet\text{OH}$ όσο και για τις ρίζες DPPH, τα δείγματα παρουσιάζουν ανάλογη συμπεριφορά. Συγκεκριμένα, η ακινητοποίηση της σερικίνης στην επιφάνεια της σίλικα ενισχύει την αντιοξειδωτική δράση της σε σύγκριση με την χρήση υδατικού διαλύματος σερικίνης ίδιας περιεκτικότητας κ.β.

Πίνακας 3-9. Ικανότητα εξουδετέρωσης των ριζών υδροξυλίου (μmol) και των ριζών DPPH (μmol) ανά γραμμάριο αντιοξειδωτικού.

Αντιοξειδωτικό (33ppm)	Εξουδετέρωση ριζών DPPH (μmol/ γραμμάριο δείγματος) (± 0.01)	Εξουδετέρωση ριζών OH (μmol/ γραμμάριο δείγματος) (± 0.01)
<i>Sericin (aqueous solution 10%)</i>	85	53
<i>Sericin (aqueous solution 20%)</i>	112	70
<i>SiO₂@sericin (20%)</i>	202	100
<i>SiO₂@sericin (10%)</i>	308	120

Καθώς αυξάνεται η ποσότητα σερικίνης που έχει ακινητοποιηθεί στην επιφάνεια της σίλικα, παρατηρείται μείωση τόσο της ικανότητας εξουδετέρωσης των ριζών DPPH όσο και των ριζών υδροξυλίου ($\bullet\text{OH}$) (**Εικόνα 3-86**). Οι μοριακοί υπολογισμοί δείχνουν ότι όταν η σερικίνη ακινητοποιείται στην επιφάνεια της σίλικα σε συγκέντρωση 20% κ.β, η αντιοξειδωτική δράση του υβριδικού υλικού SiO₂@sericin έναντι των ριζών DPPH διπλασιάζεται σε σύγκριση με εκείνη του υδατικού διαλύματος σερικίνης 20%. Όταν η σερικίνη ακινητοποιείται στην επιφάνεια της σίλικα σε συγκέντρωση 10%, η ικανότητα εξουδετέρωσης ριζών DPPH τριπλασιάζεται σε σύγκριση με εκείνη του υδατικού διαλύματος σερικίνης 10% κ.β. (**Εικόνα 3-86**). Όσον αφορά την αντιοξειδωτική ικανότητα έναντι των ριζών υδροξυλίου ($\bullet\text{OH}$), η ακινητοποίηση της σερικίνης στην επιφάνεια της σίλικα σε ποσοστό 20% αυξάνει τη δραστικότητα του υβριδικού υλικού κατά 1.4 φορές έναντι του υδατικού διαλύματος 20% κ.β, ενώ η ακινητοποίηση της σερικίνης σε ποσοστό 10% οδηγεί σε αύξηση της αντιοξειδωτικής δραστικότητάς της κατά 2.3 φορές σε σχέση με το υδατικό διάλυμα 10% κ.β.



Εικόνα 3-86. Η ικανότητα εξουδετέρωσης των ριζών υδροξυλίου ($\bullet\text{OH}$) και DPPH, εκφρασμένη σε μmol ανά γραμμάριο του αντίστοιχου δείγματος αντιοξειδωτικού.

3.5.3. Συμπεράσματα

Επιτεύχθηκε η σύνθεση δύο νέων υβριδικών αντιοξειδωτικών υλικών μέσω ομοιοπολικής τροποποίησης της επιφάνειας της σίλικα με σερικίνη: $\text{SiO}_2@\text{sericin}$ (10% φόρτωση σερικίνης) και $\text{SiO}_2@\text{sericin}$ (20% φόρτωση σερικίνης). Η εκτενής διερεύνηση της αντιοξειδωτικής τους δράσης στη μεταφορά ατόμων υδρογόνου (HAT) προς απόσβεση ριζών DPPH αποκαλύπτει μια αξιοσημείωτη ενίσχυση της αντιοξειδωτικής δράσης της σερικίνης όταν χρησιμοποιούνται τα υλικά $\text{SiO}_2@\text{sericin}$ (10% φόρτωση σερικίνης) και $\text{SiO}_2@\text{sericin}$ (20% φόρτωση σερικίνης) σε σχέση με το υδατικό διάλυμα της σερικίνης αντίστοιχης περιεκτικότητας κ.β.

Καλύτερη αντιοξειδωτική δράση από όλα τα υλικά εμφανίζει το υβριδικό υλικό **$\text{SiO}_2@\text{sericin}$ (10% φόρτωση σερικίνης)**, το οποίο επιδεικνύει **3πλάσια αύξηση της αντιοξειδωτικής HAT δραστηριότητας** έναντι των ριζών DPPH σε σχέση με το υδατικό διάλυμα 10% σερικίνης. Αμέσως μετά ακολουθεί το υβριδικό υλικό **$\text{SiO}_2@\text{sericin}$ (20% φόρτωση**

σερικίνης) το οποίο παρουσιάζει **2πλάσια αύξηση της αντιοξειδωτικής HAT δραστηριότητας** έναντι των ριζών DPPH σε σχέση με το υδατικό διάλυμα σερικίνης 20% κ.β.

Σε ότι αφορά την αλληλεπίδραση με τις **ρίζες υδροξυλίου ($\bullet\text{OH}$)** φαίνεται ότι τα υβριδικά υλικά **$\text{SiO}_2@\text{sericin}$ (10% φόρτωση σερικίνης)** και **$\text{SiO}_2@\text{sericin}$ (20% φόρτωση σερικίνης)** δρουν ως **κλασικά αντιοξειδωτικά**, **θυσιάζονται** τα ίδια και αλληλεπιδρούν με τις ρίζες $\bullet\text{OH}$. Ακολουθείται το ίδιο προφίλ με αυτό έναντι των ριζών DPPH. Δηλαδή, το **καλύτερο αντιοξειδωτικό** είναι το **$\text{SiO}_2@\text{sericin}$ (10% φόρτωση σερικίνης)** και ακολουθεί το υβριδικό υλικό **$\text{SiO}_2@\text{sericin}$ (20% φόρτωση σερικίνης)**. Σημειώνεται ότι και τα δύο υβριδικά υλικά είναι καλύτερα αντιοξειδωτικά από αντίστοιχα υδατικά διαλύματα σερικίνης ίδιας περιεκτικότητας.

Με σύγκριση της αντιοξειδωτικής δράσης των υβριδικών υλικών έναντι των ριζών DPPH και OH φαίνεται ότι **όσο αυξάνεται το φορτίο της σερικίνης στην επιφάνεια της σίλικα, τόσο μειώνεται η αντιοξειδωτική δράση του υβριδικού υλικού**. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι, σύμφωνα με τις αναλύσεις μέσω DLS, ZP, και τις φασματοσκοπίες FT-IR και Raman, το υβριδικό υλικό **$\text{SiO}_2@\text{sericin}$ (20% φόρτωση σερικίνης)** παρουσιάζει προφίλ που προσομοιάζει περισσότερο με εκείνο του **υδατικού διαλύματος της σερικίνης ίδιας περιεκτικότητας κ.β.** Αντίθετα, το υβριδικό υλικό **$\text{SiO}_2@\text{sericin}$ (10% φόρτωση σερικίνης)** προσομοιάζει κυρίως με το προφίλ της σίλικα, ενώ ταυτόχρονα εμφανίζει και ορισμένα χαρακτηριστικά της σερικίνης.

Κεφάλαιο 4: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

4. Συμπεράσματα

Παρά την εκτεταμένη ανάπτυξη και μελέτη υβριδικών αντιοξειδωτικών υλικών, υπάρχει περιορισμένη βιβλιογραφία σε ότι αφορά υβριδικά υλικά με βάση το μετάξι και αξιολόγηση της δράσης των υβριδικών υλικών έναντι των ριζών $\bullet\text{OH}$, με χρήση φασματοσκοπίας EPR.

Στο πλαίσιο της παρούσας διδακτορικής διατριβής παρέχεται μια εκτεταμένη μελέτη **σύνθεσης και αξιολόγησης της αντιοξειδωτικής δράσης** υβριδικών υλικών που έχουν ως **μήτρα το αποκομμωμένο μετάξι (SFd)**. Αρχικά πραγματοποιήθηκε **σύνθεση και χαρακτηρισμός** τριών υβριδικών υλικών με βάση τα μονομερή του υαλουρονικού οξέος, **D-Γλυκουρονικό οξύ και N-Ακετυλ-D-Γλυκοζαμίνη: SFd@GLA, SFd@GLAM** αντίστοιχα καθώς και το διπλά εμβολιασμένο υβριδικό υλικό **GLA@SFd@GLAM**, όπου τα δύο μονομερή του υαλουρονικού οξέος ακινητοποιούνται στην ίδια επιφάνεια του αποκομμωμένου μεταξιού σε μοριακή αναλογία [GLA:GLAM] [2:1]. Πραγματοποιήθηκε επιπλέον σύνθεση και χαρακτηρισμός του υβριδικού υλικού **SFd@GA**, όπου το **γαλλικό οξύ** μέσω της **μεθόδου sol-gel** ακινητοποιήθηκε με **ομοιοπολική σύνθεση** στην επιφάνεια του **αποκομμωμένου μεταξιού (SFd)**. Οι χαρακτηρισμοί όλων των υβριδικών υλικών πραγματοποιήθηκαν μέσω της χρήσης διαφόρων τεχνικών χαρακτηρισμού όπως: TG-DTA, SEM, FT-IR, Raman και EPR, που πιστοποιούν την επιτυχή ακινητοποίηση των αντιοξειδωτικών στην επιφάνεια των SFd.

Από την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης αυτών των τεσσάρων υβριδικών υλικών: **SFd@GLA, SFd@GLAM, GLA@SFd@GLAM και SFd@GA**, έναντι των ριζών DPPH, αποδείχθηκε ότι όλα τα υβριδικά υλικά μπορούν να επαναχρησιμοποιηθούν αρκετές φορές χωρίς να υποστεί καμία αλλοίωση η αντιοξειδωτική τους ικανότητα. Την **καλύτερη αντιοξειδωτική δράση** ως προς τις ρίζες DPPH καθώς και τη **μεγαλύτερη ικανότητα επαναχρησιμοποίησης** την εμφανίζει το υβριδικό υλικό **SFd@GA**, καθώς συνολικά μπορεί να εξουδετερώσει **55 μmol ριζών DPPH/gr SFd@GA** και μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί έως και **15 φορές** παραμένοντας άθικτο. Ακολουθεί το διπλά εμβολιασμένο υβριδικό υλικό **GLA@SFd@GLAM** το οποίο είναι ικανό να εξουδετερώσει συνολικά **11 μmol ριζών DPPH/gr GLA@SFd@GLAM** και μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί έως και **10 φορές**.

Κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της μεταπτυχιακής μου διατριβής συντέθηκαν χαρακτηρίστηκαν και αξιολογήθηκαν με επιτυχία ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση έναντι

των ριζών DPPH υβριδικά υλικά με βάση τα μονομερή του υαλουρονικού οξέος και το γαλλικό οξύ, με βασική διαφορά ότι σαν **υλικό υποστήριξης** χρησιμοποιήθηκε η **σίλικα**. Τα υβριδικά υλικά ήταν: **SiO₂@GLA**, **SiO₂@GLAM**, **GLA@SiO₂@GLAM** και **SiO₂@GA**, τα οποία ακολουθούν το ίδιο μοτίβο έναντι των ριζών DPPH με τα υβριδικά υλικά που έχουν ως μήτρα το μετάξι με μια βασική διαφορά, τα υβριδικά υλικά **SiO₂@GLA**, **SiO₂@GLAM**, **GLA@SiO₂@GLAM** και **SiO₂@GA** **δεν μπορούν να επαναχρησιμοποιηθούν**.

Στο πλαίσιο της παρούσας διδακτορικής διατριβής εισαγάγαμε για **πρώτη φορά στη βιβλιογραφία** μια **συγκριτική μελέτη** της αντιοξειδωτικής δράσης των υβριδικών υλικών **SiO₂@GLA**, **SiO₂@GLAM**, **GLA@SiO₂@GLAM** και **SiO₂@GA** έναντι τόσο των ριζών DPPH, όσο και των ριζών OH. Η μελέτη της **αντιοξειδωτικής δράσης** των πιο πάνω υβριδικών υλικών **έναντι των •OH** πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της φασματοσκοπίας **Ηλεκτρονικού Παραμαγνητικού Συντονισμού (EPR)**. Τα ευρήματα της φασματοσκοπίας EPR έδειξαν ότι **καλύτερο αντιοξειδωτικό έναντι** των ριζών υδροξυλίου είναι και πάλι το υβριδικό υλικό **SiO₂@GA** το οποίο μπορεί να εξουδετερώσει **16.1mmol ριζών OH/ gr SiO₂@GA**. Ακολουθεί το υβριδικό υλικό **SiO₂@GLA** το οποίο μπορεί να εξουδετερώσει **6.2mmol ριζών OH/ gr SiO₂@GLA**.

Τα συμπεράσματα που προέκυψαν από τη συγκριτική μελέτη είναι ότι τα υβριδικά υλικά χρησιμοποιούν **διαφορετικούς μηχανισμούς για την αλληλεπίδραση με τους δύο τύπους ριζών**. Για τις ρίζες υδροξυλίου (**•OH**), οι μηχανισμοί αλληλεπίδρασης περιλαμβάνουν **Απλή Μεταφορά Ηλεκτρονίων (SET)** (για το γαλλικό οξύ, φαινολικές ενώσεις) και τη **Μεταφορά Ατόμου Υδρογόνου (HAT)** που **προέρχονται από άτομα άνθρακα (CH)** (για σάκχαρα και τα μονομερή του υαλουρονικού οξέος). Για τις ρίζες DPPH, ωστόσο, ο μηχανισμός **Μεταφοράς Ατόμου Υδρογόνου (HAT)** **χαρακτηρίζεται από την αφαίρεση ατόμων υδρογόνου από ομάδες υδροξυλίου (OH)**. Στο διπλά εμβολιασμένο υβριδικό υλικό **GLA@SiO₂@GLAM**, μια **συνεργιστική δράση** μεταξύ των δύο μονομερών **ενισχύει σημαντικά την αντιοξειδωτική ικανότητα έναντι των ριζών DPPH**. Αυτή η συνεργιστική συμπεριφορά, ωστόσο, δεν επηρεάζει την εξουδετέρωση των **•OH**. Η **μειωμένη ικανότητα** του υβριδικού υλικού να **εξουδετερώνει τις •OH** αποδίδεται σε **στερεοχημικούς περιορισμούς**, σύμφωνα με τους οποίους η χωρική διαμόρφωση των μορίων GLA και GLAM **εμποδίζει την πρόσβαση σε δεσμούς άνθρακα-υδρογόνου** που είναι απαραίτητη για την αποτελεσματική εξουδετέρωση των ριζών.

Έχοντας υπόψη μας ότι τα υβριδικά υλικά με βάση τη σίλικα εμφανίζουν αξιοσημείωτη αντιοξειδωτική δράση έναντι των ριζών OH, ο στόχος της μελέτης ήταν να διερευνηθεί κατά πόσον τα **υβριδικά υλικά** που χρησιμοποιούν το **αποκομμωμένο μετάξι (SFd)** ως υλικό υποστήριξης **αλληλεπιδρούν με ρίζες υδροξυλίου ($\bullet\text{OH}$)** και να διευκρινιστεί ο μηχανισμός αλληλεπίδρασής τους. Επιπλέον, στόχος της μελέτης ήταν να αξιολογηθεί η **δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης** αυτών των υβριδικών υλικών **μετά την αλληλεπίδρασή τους με ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου**, αφού είδαμε ότι μπορούν να ξαναχρησιμοποιηθούν μετά την αλληλεπίδραση τους με ρίζες DPPH.

Προς μεγάλη μας έκπληξη τα αποτελέσματα από την μελέτη της αλληλεπίδρασης των υβριδικών υλικών **SFd@GLA, SFd@GLAM, GLA@SFd@GLAM και SFd@GA** με τις $\bullet\text{OH}$ έδειξαν ότι τόσο τα **υβριδικά υλικά** όσο και το **φυσικό μετάξι** το οποίο περιέχει επιφανειακά την σερικίνη εμφανίζουν ένα **προστατευτικό πλέγμα** το οποίο δεν επιτρέπει στις ρίζες $\bullet\text{OH}$ να αλληλεπιδράσουν μαζί τους. Τα υβριδικά υλικά **SFd@GLA και SFd@GLAM** παρουσιάζουν **αντιοξειδωτικές αυτοπροστατευτικές ιδιότητες**- ωστόσο, είναι εν μέρει ευαίσθητα στην **αποικοδόμηση από ρίζες OH**. Αντίθετα, το υβριδικό υλικό **GLA@SFd@GLAM** και το φυσικό **μετάξι** εμφανίζουν ισχυρή **αντιοξειδωτική αυτοπροστασία**, ελαχιστοποιώντας αποτελεσματικά τις αλληλεπιδράσεις τους με τις ρίζες $\bullet\text{OH}$. Επιπλέον το διπλά εμβολιασμένο υβριδικό υλικό **GLA@SFd@GLAM** μπορεί να **διατηρήσει την αυτοπροστασία** του για δύο κύκλους, ενώ μετά αναγκαστικά αρχίζει να **αλληλεπιδρά** με τις ρίζες υδροξυλίου και να τις **εξουδετερώνει**.

Το υβριδικό υλικό **SFd@GA** παρουσίασε το **υψηλότερο επίπεδο αντιοξειδωτικής αυτοπροστασίας**, **αποτρέποντας** αποτελεσματικά **οποιαδήποτε αλληλεπίδραση** με τις ρίζες OH. Επιπλέον, το SFd@GA **διατήρησε τις αυτοπροστατευτικές του ικανότητες για τέσσερις επαναχρησιμοποιήσεις**, μετά τους οποίους **άρχισε να αλληλεπιδρά με τις ρίζες OH** προχωρώντας στην **εξουδετέρωσή τους**. Αυτή η αλληλεπίδραση οδηγεί στη **σταδιακή εξάντληση των προσβάσιμων επιφανειακών θέσεων**, θέτοντας **ενδεχομένως σε κίνδυνο την προστατευτική αποτελεσματικότητα του υλικού με την πάροδο του χρόνου**.

Τέλος συντέθηκαν και χαρακτηρίστηκαν με επιτυχία δύο υβριδικά υλικά τα οποία είχαν ως **αντιοξειδωτικό τη σερικίνη** και ως υλικό υποστήριξης τη σίλικα, **SiO₂@sericin (10%**

φόρτωση της σερίκινης) και $\text{SiO}_2@\text{sericin}$ (20% φόρτωση της σερίκινης). Το υβριδικό υλικό $\text{SiO}_2@\text{sericin}$ (10% φόρτωση της σερίκινης) παρουσίασε την υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση μεταξύ των υλικών σερίκινης, επιδεικνύοντας **τριπλάσια αύξηση στη δραστηριότητα μεταφοράς ατόμων υδρογόνου (HAT) έναντι των ριζών DPPH σε σύγκριση με το υδατικό διάλυμα σερίκινης 10% κ.β.** Ακολούθως, το υβριδικό υλικό $\text{SiO}_2@\text{sericin}$ (20% φόρτωση της σερίκινης) εμφάνισε **διπλάσια αύξηση της δραστηριότητας HAT έναντι των ριζών DPPH σε σχέση με το υδατικό διάλυμα σερίκινης 20%.**

Όσον αφορά την αλληλεπίδραση με τις **ρίζες υδροξυλίου ($\cdot\text{OH}$)**, τα υβριδικά υλικά $\text{SiO}_2@\text{sericin}$ (τόσο με 10% όσο και με 20% φόρτωση σερίκινης) συμπεριφέρονται ως **κλασικά αντιοξειδωτικά, που θυσιάζονται για να αλληλεπιδράσουν με τις $\cdot\text{OH}$ και να τις εξουδετερώσουν.** Το προφίλ αντιοξειδωτικής δράσης που παρατηρήθηκε έναντι των ριζών DPPH συνοψίζεται στο ότι το υβριδικό υλικό $\text{SiO}_2@\text{sericin}$ (10% φόρτωση της σερίκινης) παρουσιάζει την υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση, ακολουθούμενο από το υλικό $\text{SiO}_2@\text{sericin}$ (20% φόρτωση της σερίκινης).

Το συμπέρασμα που προκύπτει είναι ότι ανάλογα με το υλικό υποστήριξης αλλάζει και η συμπεριφορά του αντιοξειδωτικού. Όταν υπάρχει ένα πρωτεϊνικό υποστήριγμα και επιφανειακά ένα αντιοξειδωτικό, τότε το υλικό εμφανίζει αυτοπροστασία και αντοχή και δεν αλληλεπιδρά με τις $\cdot\text{OH}$ για κάποιο διάστημα. Ακολούθως εξουδετερώνει τις $\cdot\text{OH}$ θυσιάζοντας το επιφανειακό αντιοξειδωτικό, με ότι αυτό σημαίνει για την περαιτέρω ακεραιότητα του υβριδικού υλικού και εν γένει πιθανά για ένα βιολογικό δείγμα όπως τρόφιμο ή δέρμα.

Βιβλιογραφία

- (1) Oliveira-brett, A. M.; Enache, T. A.; Gil, E. D. S. Natural Phenolic Antioxidants Electrochemistry : Towards a New. **2020**, No. October 2019, 1680–1726. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12566>.
- (2) Gulcin, İ. Antioxidants and Antioxidant Methods: An Updated Overview. *Arch. Toxicol.* **2020**, 94 (3), 651–715. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02689-3>.
- (3) Halliwell, B. How to Characterize an Antioxidant: An Update. *Biochem. Soc. Symp.* **1995**, 61, 73–101. <https://doi.org/10.1042/bss0610073>.
- (4) Valgimigli, L.; Baschieri, A.; Amorati, R. Antioxidant Activity of Nanomaterials. *J. Mater. Chem. B* **2018**, 6 (14), 2036–2051. <https://doi.org/10.1039/C8TB00107C>.
- (5) Fragou, F.; Theofanous, A.; Deligiannakis, Y.; Louloudi, M. Nanoantioxidant Materials: Nanoengineering Inspired by Nature. *Micromachines* **2023**, 14 (2). <https://doi.org/10.3390/mi14020383>.
- (6) Shahidi, F.; Janitha, P. K.; Wanasundara, P. D. Phenolic Antioxidants. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2009**, 8398 (1992). <https://doi.org/10.1080/10408399209527581>.
- (7) Shahidi, F.; Zhong, Y. Measurement of Antioxidant Activity. *J. Funct. Foods* **2015**, 18, 757–781. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.047>.
- (8) Shah, S. T.; Chowdhury, Z. Z.; Simarani, K.; Basirun, W. J. Nanoantioxidants: The Fourth Generation of Antioxidants—Recent Research Roadmap and Future Perspectives. *Coatings* **2022**, 31. <https://doi.org/10.3390/coatings12101568>.
- (9) Zeb, A. Concept, Mechanism, and Applications of Phenolic Antioxidants in Foods. *J. Food Biochem.* **2020**, 44 (9), 1–22. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13394>.
- (10) Kumar, H.; Bhardwaj, K.; Nepovimova, E.; Kuča, K.; Dhanjal, D. S.; Bhardwaj, S.; Bhatia, S. K.; Verma, R.; Kumar, D. Antioxidant Functionalized Nanoparticles: A Combat against Oxidative Stress. *Nanomaterials* **2020**, 10 (7), 1–31. <https://doi.org/10.3390/nano10071334>.
- (11) Halliwell, B. Antioxidants in Human Health and Disease. *Annu. Rev. Nutr.* **1996**, 16 (1), 33–50. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.16.1.33>.
- (12) Jiang, J.; Xiong, Y. L. Natural Antioxidants as Food and Feed Additives to Promote Health Bene Fi Ts and Quality of Meat Products : A Review. *MESC* **2016**, 120, 107–117. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.04.005>.
- (13) Anwar, H.; Hussain, G.; Mustafa, I. Antioxidants from Natural Sources. *Antioxidants Foods Its Appl.* **2018**, 3–28. <https://doi.org/10.5772/intechopen.75961>.
- (14) Vaiserman, A.; Koliada, A.; Zayachkivska, A.; Lushchak, O. Nanodelivery of Natural Antioxidants: An Anti-Aging Perspective. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2020**, 7 (January), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00447>.

- (15) Arriagada, F.; Günther, G.; Nos, J.; Nonell, S.; Olea-Azar, C.; Morales, J. Antioxidant Nanomaterial Based on Core–Shell Silica Nanospheres with Surface-Bound Caffeic Acid: A Promising Vehicle for Oxidation-Sensitive Drugs. *Nanomaterials* **2019**, *9* (2). <https://doi.org/10.3390/nano9020214>.
- (16) Khojasteh, A.; Mirjalili, M. H.; Alcalde, M. A.; Cusido, R. M.; Eibl, R.; Palazon, J. Powerful Plant Antioxidants: A New Biosustainable Approach to the Production of Rosmarinic Acid. *Antioxidants* **2020**, *9* (12), 1–31. <https://doi.org/10.3390/antiox9121273>.
- (17) Platzer, M.; Kiese, S.; Herfellner, T.; Schweiggert-Weisz, U.; Miesbauer, O.; Eisner, P. Common Trends and Differences in Antioxidant Activity Analysis of Phenolic Substances Using Single Electron Transfer Based Assays. *Molecules* **2021**, *26* (5). <https://doi.org/10.3390/molecules26051244>.
- (18) Fan, Y.; Liu, Y.; Gao, L.; Zhang, Y.; Yi, J. Improved Chemical Stability and Cellular Antioxidant Activity of Resveratrol in Zein Nanoparticle with Bovine Serum Albumin-caffeic Acid Conjugate. *Food Chem.* **2018**, *261* (March), 283–291. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.055>.
- (19) Choi, K.; Nam, K.; Lee, S.; Cho, G.; Jung, J.; Kim, H.; Park, B. Antioxidant Potential and Antibacterial Efficiency of Caffeic Acid-Functionalized ZnO Nanoparticles. *Nanomaterials* **2017**, *7* (6), 148. <https://doi.org/10.3390/nano7060148>.
- (20) Cao, H.; Cheng, W.; Li, C.; Pan, X.; Xie, X.; Li, T. DFT Study on the Antioxidant Activity of Rosmarinic Acid. *J. Mol. Struct. THEOCHEM* **2005**, *719* (1–3), 177–183. <https://doi.org/10.1016/j.theochem.2005.01.029>.
- (21) Arriagada, F.; Ugarte, C. Carminic Acid Linked to Silica Nanoparticles as Pigment / Antioxidant Bifunctional Excipient for Pharmaceutical Emulsions. *Pharmaceutics* **2020**, *12* (376), 17. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12040376>.
- (22) Shah, B. R.; Zhang, C.; Li, Y.; Li, B. Bioaccessibility and Antioxidant Activity of Curcumin after Encapsulated by Nano and Pickering Emulsion Based on Chitosan-Tripolyphosphate Nanoparticles. *FRIN* **2016**, *89*, 399–407. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.08.022>.
- (23) Bletsa, E.; Stathi, P.; Dimos, K.; Louloudi, M.; Deligiannakis, Y. Interfacial Hydrogen Atom Transfer by Nanohybrids Based on Humic Acid Like Polycondensates. *J. Colloid Interface Sci.* **2015**, *455*, 163–171. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.05.039>.
- (24) Shah, S. T.; Yehye, W. A.; Saad, O.; Simarani, K.; Chowdhury, Z. Z.; Alhadi, A. A.; Al-Ani, L. A. Surface Functionalization of Iron Oxide Nanoparticles with Gallic Acid as Potential Antioxidant and Antimicrobial Agents. *Nanomaterials* **2017**, *7* (10). <https://doi.org/10.3390/nano7100306>.
- (25) Badhani, B.; Sharma, N.; Kakkar, R. Gallic Acid : A Versatile Antioxidant with Promising Therapeutic and Industrial Applications. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 27540–27557. <https://doi.org/10.1039/C5RA01911G>.
- (26) El-megharbel, S. M.; Hamza, R. Z. Synthesis , Spectroscopic Characterizations , Conductometric Titration and Investigation of Potent Antioxidant Activities of Gallic

- Acid Complexes with Ca (II), Cu (II), Zn (III), Cr (III) and Se (IV) Metal Ions. *J. Mol. Liq.* **2022**, 358, 119196. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2022.119196>.
- (27) Li, S. Y. Functionalized Selenium Nanoparticles with Nephroprotective Activity, the Important Roles of ROS- Mediated Signaling Pathways. *J. Mater. Chem. B* **2013**, 1 (207890). <https://doi.org/10.1039/c3tb21168a>.
 - (28) Nie, Z.; Liu, K. J.; Zhong, C. J.; Wang, L. F.; Yang, Y.; Tian, Q.; Liu, Y. Enhanced Radical Scavenging Activity by Antioxidant-Functionalized Gold Nanoparticles: A Novel Inspiration for Development of New Artificial Antioxidants. *Free Radic. Biol. Med.* **2007**, 43 (9), 1243–1254. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.06.011>.
 - (29) Kumar, A.; Kumar, S.; Chand, U. Quercetin and Gallic Acid Mediated Synthesis of Bimetallic (Silver and Selenium) Nanoparticles and Their Antitumor and Antimicrobial Potential. *J. Colloid Interface Sci.* **2014**, 431, 194–199. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2014.06.030>.
 - (30) Anwer, K.; Al-mansoor, M. A.; Jamil, S.; Al-shdefat, R.; Nazam, M.; Shakeel, F. Development and Evaluation of PLGA Polymer Based Nanoparticles of Quercetin. *Int. J. Biol. Macromol.* **2016**, 92, 213–219. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.07.002>.
 - (31) Arriagada, F.; Correa, O.; Nonell, S.; Mura, F.; Olea-azar, C.; Morales, J. Morin Flavonoid Adsorbed on Mesoporous Silica , a Novel Antioxidant Nanomaterial. **2016**, 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164507>.
 - (32) Elle, R. E.; Rahmani, S.; Morena, M.; Philippe, L.; Boulahtouf, A.; Balaguer, P.; Cristol, J.; Durand, J.; Charnay, C.; Badia, E. Functionalized Mesoporous Silica Nanoparticle with Antioxidants as a New Carrier That Generates Lower Oxidative Stress Impact on Cells. *Mol. Pharm.* **2016**. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.6b00190>.
 - (33) Cai, J.; Fu, J.; Li, R.; Zhang, F.; Ling, G.; Zhang, P. A Potential Carrier for Anti-Tumor Targeted Delivery-Hyaluronic Acid Nanoparticles. *Carbohydr. Polym.* **2019**, 208 (June 2018), 356–364. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.12.074>.
 - (34) Yasin, A.; Ren, Y.; Li, J.; Sheng, Y.; Cao, C.; Zhang, K. Advances in Hyaluronic Acid for Biomedical Applications. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2022**, 10 (July), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.910290>.
 - (35) Brown, M.; Jones, S. Hyaluronic Acid: A Unique Topical Vehicle for the Localized Delivery of Drugs to the Skin. *J. Eur. Acad. Dermatology Venereol.* **2005**, 19 (3), 308–318. <https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2004.01180.x>.
 - (36) Nayak, D.; Prity, A.; Ashe, S.; Ranjan, P.; Kumari, M.; Chopra, P.; Nayak, B. Synergistic Combination of Antioxidants , Silver Nanoparticles and Chitosan in a Nanoparticle Based Formulation : Characterization and Cytotoxic Effect on MCF-7 Breast Cancer Cell Lines. *J. Colloid Interface Sci.* **2016**, 470, 142–152. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2016.02.043>.
 - (37) Huq, T.; Khan, A.; Brown, D.; Dhayagude, N.; He, Z.; Ni, Y. Sources, Production and Commercial Applications of Fungal Chitosan: A Review. *J. Bioresour. Bioprod.* **2022**, 7 (2), 85–98. <https://doi.org/10.1016/j.jobab.2022.01.002>.

- (38) Bharathi, D.; Ranjithkumar, R.; Vasantharaj, S.; Chandarshekar, B.; Bhuvaneshwari, V. Synthesis and Characterization of Chitosan / Iron Oxide Nanocomposite for Biomedical Applications. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *132*, 880–887. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.233>.
- (39) Qiu, Y.; Wang, Z.; Owens, A. C. E.; Kulaots, I.; Chen, Y.; Kane, A. B.; Hurt, R. H. Antioxidant Chemistry of Graphene-Based Materials and Its Role in Oxidation Protection Technology. *Nanoscale* **2014**, *6* (20), 11744–11755. <https://doi.org/10.1039/C4NR03275F>.
- (40) Rodríguez-Varillas, S.; Fontanil, T.; Obaya, Á. J.; Fernández-González, A.; Murru, C.; Badía-Laiño, R. Biocompatibility and Antioxidant Capabilities of Carbon Dots Obtained from Tomato (*Solanum Lycopersicum*). *Appl. Sci.* **2022**, *12* (2), 773. <https://doi.org/10.3390/app12020773>.
- (41) Li, Y.; Li, X.; Zheng, W.; Fan, C.; Zhang, Y.; Chen, T. Functionalized Selenium Nanoparticles with Nephroprotective Activity, the Important Roles of ROS-Mediated Signaling Pathways. *J. Mater. Chem. B* **2013**, *1* (46), 6365–6372. <https://doi.org/10.1039/c3tb21168a>.
- (42) P'yanova, L. G.; Drozdov, V. A.; Sedanova, A. V.; Drozdetskaya, M. S.; Glyzdova, M. V.; Kravchenko, E. A. Synthesis of Modified Carbon Sorbents and a Study of Their Antioxidant Properties. *Prot. Met. Phys. Chem. Surfaces* **2018**, *54* (6), 1010–1014. <https://doi.org/10.1134/S2070205118060217>.
- (43) Skrypnik, L.; Babich, O.; Sukhikh, S.; Shishko, O.; Ivanova, S.; Mozhei, O.; Kochish, I.; Nikonov, I. A Study of the Antioxidant, Cytotoxic Activity and Adsorption Properties of Karelian Shungite by Physicochemical Methods. *Antioxidants* **2021**, *10* (7). <https://doi.org/10.3390/antiox10071121>.
- (44) Sajo, M. E. J.; Kim, C. S.; Kim, S. K.; Shim, K. Y.; Kang, T. Y.; Lee, K. J. Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects of Shungite against Ultraviolet B Irradiation-Induced Skin Damage in Hairless Mice. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/7340143>.
- (45) Seal, S.; Jeyaranjan, A.; Neal, C. J.; Kumar, U.; Sakthivel, T. S.; Sayle, D. C. Engineered Defects in Cerium Oxides: Tuning Chemical Reactivity for Biomedical, Environmental, & Energy Applications. *Nanoscale* **2020**, *12* (13), 6879–6899. <https://doi.org/10.1039/d0nr01203c>.
- (46) Nelson, B. C.; Johnson, M. E.; Walker, M. L.; Riley, K. R.; Sims, C. M. Antioxidant Cerium Oxide Nanoparticles in Biology and Medicine. *Antioxidants* **2016**, *5* (2), 1–21. <https://doi.org/10.3390/antiox5020015>.
- (47) Sharpe, E.; Andreescu, D.; Andreescu, S. Artificial Nanoparticle Antioxidants. *ACS Symp. Ser.* **2011**, *1083*, 235–253. <https://doi.org/10.1021/bk-2011-1083.ch008>.
- (48) Polak, J.; Bartoszek, M. The Study of Antioxidant Capacity of Varieties of Nalewka, a Traditional Polish Fruit Liqueur, Using EPR, NMR and UV–Vis Spectroscopy. *J. Food Compos. Anal.* **2015**, *40*, 114–119. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2015.01.006>.

- (49) Prasad, S.; Gupta, S. C.; Tyagi, A. K. Reactive Oxygen Species (ROS) and Cancer : Role of Antioxidative Nutraceuticals. *Cancer Lett.* **2017**, *387*, 95–105. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.03.042>.
- (50) Phaniendra, A.; Jestadi, D. B.; Periyasamy, L. Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian J. Clin. Biochem.* **2015**, *30* (1), 11–26. <https://doi.org/10.1007/s12291-014-0446-0>.
- (51) Lushchak, V. I. Free Radicals , Reactive Oxygen Species , Oxidative Stress and Its Classification. *Chem. Biol. Interact.* **2014**, *224*, 164–175. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.10.016>.
- (52) Hawkins, C. L.; Davies, M. J. Detection and Characterisation of Radicals in Biological Materials Using EPR Methodology. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **2014**, *1840* (2), 708–721. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.03.034>.
- (53) Suzen, S.; Gurer-Orhan, H.; Saso, L. Detection of Reactive Oxygen and Nitrogen Species by Electron Paramagnetic Resonance (EPR) Technique. *Molecules* **2017**, *22* (1), 1–9. <https://doi.org/10.3390/molecules22010181>.
- (54) Fadda, A.; Barberis, A.; Sanna, D. Influence of PH, Buffers and Role of Quinolinic Acid, a Novel Iron Chelating Agent, in the Determination of Hydroxyl Radical Scavenging Activity of Plant Extracts by Electron Paramagnetic Resonance (EPR). *Food Chem.* **2018**, *240*, 174–182. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.076>.
- (55) COMMONER, B.; TOWNSEND, J.; PAKE, G. E. Free Radicals in Biological Materials. *Nature* **1954**, *174* (4432), 689–691. <https://doi.org/10.1038/174689a0>.
- (56) Taub, T.; Ruthstein, S.; Cohen, H. The Involvement of Carbon-Centered Radicals in the Aging Process of Coals under Atmospheric Conditions: An EPR Study. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2018**, *20* (42), 27025–27035. <https://doi.org/10.1039/c8cp04098b>.
- (57) Lednor, P. W.; Versloot, P. C. Radical-Anion Chemistry of Carbon Monoxide. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1983**, *983* (6), 284. <https://doi.org/10.1039/c39830000284>.
- (58) Lei, Y.; Lei, X.; Westerhoff, P.; Zhang, X.; Yang, X. Reactivity of Chlorine Radicals (Cl• and Cl₂•-) with Dissolved Organic Matter and the Formation of Chlorinated Byproducts. *Environ. Sci. Technol.* **2021**, *55* (1), 689–699. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c05596>.
- (59) Pokrovski, G. S.; Kokh, M. A.; Desmaele, E.; Laskar, C.; Bazarkina, E. F.; Borisova, A. Y.; Testemale, D.; Hazemann, J. L.; Vuilleumier, R.; Ferlat, G.; Saitta, A. M. The Trisulfur Radical Ion S₃•- Controls Platinum Transport by Hydrothermal Fluids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2021**, *118* (34). <https://doi.org/10.1073/pnas.2109768118>.
- (60) Wang, Y.; Branicky, R.; Noë, A.; Hekimi, S. Superoxide Dismutases : Dual Roles in Controlling ROS Damage and Regulating ROS Signaling. *J. Cell Biol.* **2014**, 1915–1928. <https://doi.org/10.1083/jcb.201708007>.
- (61) Ulas, G.; Lemmin, T.; Wu, Y.; Gassner, G. T.; DeGrado, W. F. Designed Metalloprotein Stabilizes a Semiquinone Radical. *Nat. Chem.* **2016**, *8* (4), 354–359.

<https://doi.org/10.1038/nchem.2453>.

- (62) Shafirovich, V.; Dourandin, A.; Huang, W.; Geacintov, N. E. The Carbonate Radical Is a Site-Selective Oxidizing Agent of Guanine in Double-Stranded Oligonucleotides * Rived from the Photodissociation of Persulfate Anions. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (27), 24621–24626. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101131200>.
- (63) Das, B.; Makol, A.; Kundu, S. Phosphorus Radicals and Radical Ions. *Dalt. Trans.* **2022**, *51* (33), 12404–12426. <https://doi.org/10.1039/d2dt01499h>.
- (64) Scurti, S.; Caretti, D.; Mollica, F.; Di Antonio, E.; Amorati, R. Chain-Breaking Antioxidant and Peroxyl Radical Trapping Activity of Phenol-Coated Magnetic Iron Oxide Nanoparticles. *Antioxidants* **2022**, *11* (6). <https://doi.org/10.3390/antiox11061163>.
- (65) Hasanuzzaman, M.; Bhuyan, M. H. M. B.; Zulfiqar, F.; Raza, A.; Mohsin, S. M.; Al Mahmud, J.; Fujita, M.; Fotopoulos, V. Reactive Oxygen Species and Antioxidant Defense in Plants under Abiotic Stress: Revisiting the Crucial Role of a Universal Defense Regulator. *Antioxidants* **2020**, *9* (8), 1–52. <https://doi.org/10.3390/antiox9080681>.
- (66) Dad, S.; Bisby, R. H.; Clark, I. P.; Parker, A. W. Formation of Singlet Oxygen from Solutions of Vitamin E. *Free Radic. Res.* **2006**, *40* (3), 333–338. <https://doi.org/10.1080/10715760500491174>.
- (67) Stathi, P.; Fotou, E.; Moussis, V.; Tsikaris, V.; Louloudi, M.; Deligiannakis, Y. Control of Tyrosyl Radical Stabilization by {SiO₂@Oligopeptide} Hybrid Biomimetic Materials. *Langmuir* **2022**, *38* (32), 9799–9809. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.2c00710>.
- (68) Dixon, W. T.; Murphy, D. Determination of the Acidity Constants of Some Phenol Radical Cations by Means of Electron Spin Resonance. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2* **1976**, *72*, 1221. <https://doi.org/10.1039/f29767201221>.
- (69) Karoui, H.; Hogg, N.; Fréjaville, C.; Tordo, P.; Kalyanaraman, B. Characterization of Sulfur-Centered Radical Intermediates Formed during the Oxidation of Thiols and Sulfite by Peroxynitrite. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271* (11), 6000–6009. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.11.6000>.
- (70) Xia, X.; Zhu, F.; Li, J.; Yang, H.; Wei, L.; Li, Q.; Jiang, J.; Zhang, G.; Zhao, Q. A Review Study on Sulfate-Radical-Based Advanced Oxidation Processes for Domestic/Industrial Wastewater Treatment: Degradation, Efficiency, and Mechanism. *Front. Chem.* **2020**, *8* (November). <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.592056>.
- (71) Nosaka, Y.; Nosaka, A. Y. Generation and Detection of Reactive Oxygen Species in Photocatalysis. *Chem. Rev.* **2017**, *117* (17), 11302–11336. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00161>.
- (72) Rubio, L.; Pyrgiotakis, G.; Beltran-Huarac, J.; Zhang, Y.; Gaurav, J.; Deloid, G.; Spyrogiani, A.; Sarosiek, K. A.; Bello, D.; Demokritou, P. Safer-by-Design Flame-Sprayed Silicon Dioxide Nanoparticles: The Role of Silanol Content on ROS Generation, Surface Activity and Cytotoxicity. *Part. Fibre Toxicol.* **2019**, *16* (1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12989-019-0325-1>.

- (73) Radi, R. Protein Tyrosine Nitration: Biochemical Mechanisms and Structural Basis of Functional Effects. *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46* (2), 550–559. <https://doi.org/10.1021/ar300234c>.
- (74) Martínez, M. C.; Andriantsitohaina, R. Reactive Nitrogen Species: Molecular Mechanisms and Potential Significance in Health and Disease. *Antioxidants Redox Signal.* **2009**, *11* (3), 669–702. <https://doi.org/10.1089/ars.2007.1993>.
- (75) Helberg, J.; Pratt, D. A. Autoxidation vs. Antioxidants-the Fight for Forever. *Chem. Soc. Rev.* **2021**, *50* (13), 7343–7358. <https://doi.org/10.1039/d1cs00265a>.
- (76) Cao, C.; Chen, Y.; Wu, Y.; Deumens, E. OPAL : A Multiscale Multicenter Simulation Package Based on MPI-2 Protocol. *Int. J. Quantum Chem.* **2011**, *111* (2011), 4020–4029. <https://doi.org/10.1002/qua>.
- (77) Ghosh, S.; Castillo-Lora, J.; Soudackov, A. V.; Mayer, J. M.; Hammes-Schiffer, S. Theoretical Insights into Proton-Coupled Electron Transfer from a Photoreduced ZnO Nanocrystal to an Organic Radical. *Nano Lett.* **2017**, *17* (9), 5762–5767. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.7b02642>.
- (78) Agarwal, R. G.; Kim, H. J.; Mayer, J. M. Nanoparticle O-H Bond Dissociation Free Energies from Equilibrium Measurements of Cerium Oxide Colloids. *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143* (7), 2896–2907. <https://doi.org/10.1021/jacs.0c12799>.
- (79) Mayer, J. M.; Hrovat, D. A.; Thomas, J. L.; Borden, W. T. Proton-Coupled Electron Transfer versus Hydrogen Atom Transfer in Benzyl/Toluene, Methoxyl/Methanol, and Phenoxyl/Phenol Self-Exchange Reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (37), 11142–11147. <https://doi.org/10.1021/ja012732c>.
- (80) Najafi, M. On the Antioxidant Activity of the Ortho and Meta Substituted Daidzein Derivatives in the Gas Phase and Solvent Environment. *J. Mex. Chem. Soc.* **2014**, *58* (1), 36–45.
- (81) Di Meo, F.; Lemaure, V.; Cornil, J.; Lazzaroni, R.; Duroux, J.; Olivier, Y.; Trouillas, P. Free Radical Scavenging by Natural Polyphenols: Atom versus Electron Transfer. *J. Phys. Chem. A* **2013**, *117* (10), 2082–2092. <https://doi.org/10.1021/jp3116319>.
- (82) Mfomo, J. Z.; Mama, D. B.; Lissouck, D.; Younang, E.; Samuel, N.; Ndassa, I. M.; Mbaze, L.; Zobo, J.; Mama, D. B.; Lissouck, D. Thermodynamics-Antioxidant Activity Relationships of Some 4-Benzylidenamino-4 , Theoretical Evaluation. *Int. J. Food Prop.* **2017**, *20* (9), 1935–1948. <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1225307>.
- (83) Capaldo, L.; Ravelli, D. Hydrogen Atom Transfer (HAT): A Versatile Strategy for Substrate Activation in Photocatalyzed Organic Synthesis. *European J. Org. Chem.* **2017**, *2017* (15), 2056–2071. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201601485>.
- (84) Hammes-schiffer, S. Comparison of Hydride , Hydrogen Atom , and Proton-Coupled Electron Transfer Reactions. *ChemPhysChem WILEY-VCH-Verlag GmbH* **2002**, *16802*, 33–42. [https://doi.org/10.1002/1439-7641\(20020118\)3:1<33::AID-CPHC33>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/1439-7641(20020118)3:1<33::AID-CPHC33>3.0.CO;2-6).
- (85) Mayer, J. M. Understanding Hydrogen Atom Transfer: From Bond Strengths to Marcus

- Theory. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44* (1), 36–46. <https://doi.org/10.1021/ar100093z>.
- (86) Katarina, N. M. Mechanistic Studies of Phenolic Antioxidants in Reaction with Nitrogen- and Oxygen-Centered Radicals. *J. Mol. Struct. THEOCHEM* **2007**, *818* (1–3), 141–150. <https://doi.org/10.1016/j.theochem.2007.05.011>.
- (87) Theofanous, A.; Sarli, I.; Fragou, F.; Bletsa, E.; Deligiannakis, Y.; Louloudi, M. Antioxidant Hydrogen-Atom-Transfer to DPPH Radicals by Hybrids of {Hyaluronic-Acid Components}@SiO₂. *Langmuir* **2022**, *38* (40), 12333–12345. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.2c02021>.
- (88) Dokki, C. Methods for Determining the Antioxidant Activity: A Review. *Alexandria J. Food Sci. Technol.* **2014**, *11* (1), 31–42. <https://doi.org/10.12816/0025348>.
- (89) Alam, N.; Bristi, N. J. Review on in Vivo and in Vitro Methods Evaluation of Antioxidant Activity. *Saudi Pharm. J.* **2013**, *21* (2), 143–152. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2012.05.002>.
- (90) Boligon, A. A. Technical Evaluation of Antioxidant Activity. *Med. Chem. (Los. Angeles)*. **2014**, *4* (7). <https://doi.org/10.4172/2161-0444.1000188>.
- (91) Antônio, E.; Antunes, R.; Araújo, I. S. De; Khalil, N. M.; Mainardes, R. M. Poly (Lactic Acid) Nanoparticles Loaded with Ursolic Acid : Characterization and in Vitro Evaluation of Radical Scavenging Activity and Cytotoxicity. *Mater. Sci. Eng. C* **2017**, *71*, 156–166. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.09.080>.
- (92) Fa, M.; Yang, D.; Gao, L.; Zhao, R.; Luo, Y.; Yao, X. The Effect of AuNP Modification on the Antioxidant Activity of CeO₂ Nanomaterials with Different Morphologies Mengmei. *Appl. Surf. Sci.* **2018**, *457* (June), 352–359. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2018.06.277>.
- (93) Silveri, F.; Della Pelle, F.; Scroccarello, A.; Mazzotta, E.; Di Giulio, T.; Malitesta, C.; Compagnone, D. Carbon Black Functionalized with Naturally Occurring Compounds in Water Phase for Electrochemical Sensing of Antioxidant Compounds. *Antioxidants* **2022**, *11* (10). <https://doi.org/10.3390/antiox11102008>.
- (94) Teerasong, S.; Jinnarak, A.; Chaneam, S.; Wilairat, P. Poly (Vinyl Alcohol) Capped Silver Nanoparticles for Antioxidant Assay Based on Seed-Mediated Nanoparticle Growth. *Talanta* **2017**, *170* (April), 193–198. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.04.009>.
- (95) Vernekar, A. A.; Sinha, D.; Srivastava, S.; Paramasivam, P. U.; Silva, P. D.; Mughesh, G. An Antioxidant Nanozyme That Uncovers the Cytoprotective Potential of Vanadia Nanowires. *Nat. Commun.* **2014**. <https://doi.org/10.1038/ncomms6301>.
- (96) Clément, J.-L.; Ferré, N.; Siri, D.; Karoui, H.; Rockenbauer, A.; Tordo, P. Assignment of the EPR Spectrum of 5,5-Dimethyl-1-Pyrroline N -Oxide (DMPO) Superoxide Spin Adduct. *J. Org. Chem.* **2005**, *70* (4), 1198–1203. <https://doi.org/10.1021/jo048518z>.
- (97) Diamantis, D. A.; Oblukova, M.; Chatziathanasiadou, M. V.; Gemenetzi, A.; Papaemmanouil, C.; Gerogianni, P. S.; Syed, N.; Crook, T.; Galaris, D.; Deligiannakis,

- Y.; Sokolova, R.; Tzakos, A. G. Free Radical Biology and Medicine Bioinspired Tailoring of Fluorogenic Thiol Responsive Antioxidant Precursors to Protect Cells against H₂O₂ - Induced DNA Damage. *Free Radic. Biol. Med.* **2020**, *160* (July), 540–551. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.08.025>.
- (98) Fragou, F.; Stathi, P.; Deligiannakis, Y.; Louloudi, M. Safe-by-Design Flame Spray Pyrolysis of SiO₂ Nanostructures for Minimizing Acute Toxicity. *ACS Appl. Nano Mater.* **2022**. <https://doi.org/10.1021/acsanm.2c01273>.
- (99) Medhe, S.; Bansal, P.; Srivastava, M. M. Enhanced Antioxidant Activity of Gold Nanoparticle Embedded 3,6-Dihydroxyflavone: A Combinational Study. *Appl. Nanosci.* **2014**, *4* (2), 153–161. <https://doi.org/10.1007/s13204-012-0182-9>.
- (100) Tailor Chandra Shekhar and Goyal Anju. Antioxidant Activity by DPPH Radical Scavenging Method of Ageratum Conyzoides Linn. Leaves. *Am. J. Ethnomedicine* **2014**, *1*, 244–249.
- (101) Bhattacharya, K.; Gogoi, B.; Buragohain, A. K.; Deb, P. Fe₂O₃/C Nanocomposites Having Distinctive Antioxidant Activity and Hemolysis Prevention Efficiency. *Mater. Sci. Eng. C* **2014**, *42*, 595–600. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.05.062>.
- (102) Foti, M. C. Use and Abuse of the DPPH• Radical. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63* (40), 8765–8776. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b03839>.
- (103) Akhtar, M. S.; Rafiullah, M.; Shehata, W. A.; Hossain, A.; Ali, M. Comparative Phytochemical, Thin Layer Chromatographic Profiling and Antioxidant Activity of Extracts from Some Indian Herbal Drugs. *J. Bioresour. Bioprod.* **2022**, *7* (2), 128–134. <https://doi.org/10.1016/j.jobab.2022.01.001>.
- (104) Chen, Z.; Bertin, R.; Frolidi, G. EC₅₀ Estimation of Antioxidant Activity in DPPH* Assay Using Several Statistical Programs. *Food Chem.* **2013**, *138* (1), 414–420. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.001>.
- (105) Liu, C.; Ge, S.; Yang, J.; Xu, Y.; Zhao, M.; Xiong, L.; Sun, Q. Adsorption Mechanism of Polyphenols onto Starch Nanoparticles and Enhanced Antioxidant Activity under Adverse Conditions. *J. Funct. Foods* **2016**, *26*, 632–644. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.08.036>.
- (106) Deligiannakis, Y.; Sotiriou, G. A.; Pratsinis, S. E. Antioxidant and Antiradical SiO₂ Nanoparticles Covalently Functionalized with Gallic Acid. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2012**, *4* (12), 6609–6617. <https://doi.org/10.1021/am301751s>.
- (107) S. R. Logan. The Origin and Status of the Arrhenius Equation. *Sch. Phys. Sci. New Univ. Ulster, Coler. N. Irel.* **1982**, *59* (1), 1–11. <https://doi.org/10.1080/09668135808410134>.
- (108) Das, S.; Batuta, S.; Alam, M. N.; Fouzder, C.; Kundu, R.; Mandal, D.; Begum, N. A. Antioxidant Flavone Analog Functionalized Fluorescent Silica Nanoparticles: Synthesis and Exploration of Their Possible Use as Biomolecule Sensor. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2017**, *157*, 286–296. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.05.074>.
- (109) Matter, M. T.; Furer, L. A.; Starsich, F. H. L.; Fortunato, G.; Pratsinis, S. E.; Herrmann, I. K. Engineering the Bioactivity of Flame-Made Ceria and Ceria/Bioglass Hybrid

- Nanoparticles. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11* (3), 2830–2839. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b18778>.
- (110) Feng, L.; Liu, Z. Biomedical Applications of Carbon Nanomaterials. In *Biomedical Applications and Toxicology of Carbon Nanomaterials*; Wiley, 2016; pp 131–162. <https://doi.org/10.1002/9783527692866.ch5>.
- (111) Sahiner, N.; Sagbas, S.; Aktas, N. Preparation and Characterization of Monodisperse, Mesoporous Natural Poly(Tannic Acid)-Silica Nanoparticle Composites with Antioxidant Properties. *Microporous Mesoporous Mater.* **2016**, *226*, 316–324. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2016.02.012>.
- (112) Olvera Salazar, A.; García Hernández, M.; López Camacho, P. Y.; López Marure, A.; Reyes de la Torre, A. I.; Morales Ramírez, Á. de J.; Hernández Santiago, F.; Aguilera Vázquez, L. Influence of Eu³⁺ + Doping Content on Antioxidant Properties of Lu₂O₃ Sol-Gel Derived Nanoparticles. *Mater. Sci. Eng. C* **2016**, *69*, 850–855. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.07.061>.
- (113) Li, Y.; Fu, R.; Duan, Z.; Zhu, C.; Fan, D. Artificial Nonenzymatic Antioxidant MXene Nanosheet-Anchored Injectable Hydrogel as a Mild Photothermal-Controlled Oxygen Release Platform for Diabetic Wound Healing. *ACS Nano* **2021**. <https://doi.org/10.1021/acsnano.1c10575>.
- (114) Javed, R.; Usman, M.; Tabassum, S.; Zia, M. Effect of Capping Agents: Structural, Optical and Biological Properties of ZnO Nanoparticles. *Appl. Surf. Sci.* **2016**, *386*, 319–326. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2016.06.042>.
- (115) Javed, R.; Ahmed, M.; Haq, I. ul; Nisa, S.; Zia, M. PVP and PEG Doped CuO Nanoparticles Are More Biologically Active: Antibacterial, Antioxidant, Antidiabetic and Cytotoxic Perspective. *Mater. Sci. Eng. C* **2017**, *79*, 108–115. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.006>.
- (116) Gao, L.; Zhuang, J.; Nie, L.; Zhang, J.; Zhang, Y.; Gu, N.; Wang, T.; Feng, J.; Yang, D.; Perrett, S.; Yan, X. Intrinsic Peroxidase-like Activity of Ferromagnetic Nanoparticles. *Nat. Nanotechnol.* **2007**, *2* (9), 577–583. <https://doi.org/10.1038/nnano.2007.260>.
- (117) Liu, X.; Li, D.; Liang, Y.; Lin, Y.; Liu, Z.; Niu, H.; Xu, Y. Establishment of Anti-Oxidation Platform Based on Few-Layer Molybdenum Disulfide Nanosheet-Coated Titanium Dioxide Nanobelt Nanocomposite. *J. Colloid Interface Sci.* **2021**, *601*, 167–176. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2021.05.056>.
- (118) Sachdev, A.; Gopinath, P. Monitoring the Intracellular Distribution and ROS Scavenging Potential of Carbon Dot–Cerium Oxide Nanocomposites in Fibroblast Cells. *ChemNanoMat* **2016**, *2* (3), 226–235. <https://doi.org/10.1002/cnma.201500224>.
- (119) Bharathi, D.; Ranjithkumar, R.; Vasantharaj, S.; Chandarshekar, B.; Bhuvaneshwari, V. Synthesis and Characterization of Chitosan/Iron Oxide Nanocomposite for Biomedical Applications. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *132*, 880–887. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.233>.
- (120) Muniyappan, N.; Pandeewaran, M.; Amalraj, A. Green Synthesis of Gold Nanoparticles

- Using Curcuma Pseudomontana Isolated Curcumin: Its Characterization, Antimicrobial, Antioxidant and Anti- Inflammatory Activities. *Environ. Chem. Ecotoxicol.* **2021**, 3, 117–124. <https://doi.org/10.1016/j.enceco.2021.01.002>.
- (121) Huang, J.; Wang, Q.; Li, T.; Xia, N.; Xia, Q. Nanostructured Lipid Carrier (NLC) as a Strategy for Encapsulation of Quercetin and Linseed Oil: Preparation and in Vitro Characterization Studies. *J. Food Eng.* **2017**, 215, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.07.002>.
- (122) Karimi, N.; Ghanbarzadeh, B.; Hamishehkar, H.; Mehramuz, B.; Kafil, H. S. Antioxidant, Antimicrobial and Physicochemical Properties of Turmeric Extract-Loaded Nanostructured Lipid Carrier (NLC). *Colloids Interface Sci. Commun.* **2018**, 22 (November 2017), 18–24. <https://doi.org/10.1016/j.colcom.2017.11.006>.
- (123) Kim, S. J.; Chung, B. H. Antioxidant Activity of Levan Coated Cerium Oxide Nanoparticles. *Carbohydr. Polym.* **2016**, 150, 400–407. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.05.021>.
- (124) Saravanakumar, K.; Sathiyaseelan, A.; Mariadoss, A. V. A.; Wang, M. H. Antioxidant and Antidiabetic Properties of Biocompatible Ceria Oxide (CeO₂) Nanoparticles in Mouse Fibroblast NIH3T3 and Insulin Resistant HepG2 Cells. *Ceram. Int.* **2021**, 47 (6), 8618–8626. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2020.11.230>.
- (125) Dutta, D.; Mukherjee, R.; Patra, M.; Banik, M.; Dasgupta, R.; Mukherjee, M.; Basu, T. Green Synthesized Cerium Oxide Nanoparticle: A Prospective Drug against Oxidative Harm. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2016**, 147, 45–53. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.07.045>.
- (126) Nath, D.; Banerjee, P. *Green Nanotechnology - A New Hope for Medical Biology*; Elsevier B.V., 2013; Vol. 36. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2013.09.002>.
- (127) Quester, K.; Avalos-Borja, M.; Castro-Longoria, E. Biosynthesis and Microscopic Study of Metallic Nanoparticles. *Micron* **2013**, 54–55, 1–27. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2013.07.003>.
- (128) Zhang, H.; Dunphy, D. R.; Jiang, X.; Meng, H.; Sun, B.; Tarn, D.; Xue, M.; Wang, X.; Lin, S.; Ji, Z.; Li, R.; Garcia, F. L.; Yang, J.; Kirk, M. L.; Xia, T.; Zink, J. I.; Nel, A.; Brinker, C. J. Processing Pathway Dependence of Amorphous Silica Nanoparticle Toxicity: Colloidal vs Pyrolytic. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134 (38), 15790–15804. <https://doi.org/10.1021/ja304907c>.
- (129) Nichita, C.; Stamatina, I. The Antioxidant Activity of the Biohybrides Based on Carboxylated/Hydroxylated Carbon Nanotubes-Flavonoid Compounds. *Dig. J. Nanomater. Biostructures* **2012**, 8 (1), 445–455.
- (130) Ahmad, F.; Salem-Bekhit, M. M.; Khan, F.; Alshehri, S.; Khan, A.; Ghoneim, M. M.; Wu, H. F.; Taha, E. I.; Elbagory, I. Unique Properties of Surface-Functionalized Nanoparticles for Bio-Application: Functionalization Mechanisms and Importance in Application. *Nanomaterials* **2022**, 12 (8). <https://doi.org/10.3390/nano12081333>.
- (131) Mittal, A. K.; Kumar, S.; Banerjee, U. C. Quercetin and Gallic Acid Mediated Synthesis

- of Bimetallic (Silver and Selenium) Nanoparticles and Their Antitumor and Antimicrobial Potential. *J. Colloid Interface Sci.* **2014**, *431*, 194–199.
<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2014.06.030>.
- (132) Sotiriou, G. A.; Blattmann, C. O.; Deligiannakis, Y. Nanoantioxidant-Driven Plasmon Enhanced Proton-Coupled Electron Transfer. *Nanoscale* **2016**, *8* (2), 796–803.
<https://doi.org/10.1039/c5nr04942c>.
- (133) Massaro, M.; Riela, S.; Guernelli, S.; Parisi, F.; Lazzara, G.; Baschieri, A.; Valgimigli, L.; Amorati, R. A Synergic Nanoantioxidant Based on Covalently Modified Halloysite–Trolox Nanotubes with Intra-Lumen Loaded Quercetin. *J. Mater. Chem. B* **2016**, *4* (13), 2229–2241. <https://doi.org/10.1039/C6TB00126B>.
- (134) Huang, Y.; Liu, Z.; Liu, C.; Ju, E.; Zhang, Y.; Ren, J.; Qu, X. Self-Assembly of Multi-Nanozymes to Mimic an Intracellular Antioxidant Defense System. *Angew. Chemie* **2016**, *128* (23), 6758–6762. <https://doi.org/10.1002/ange.201600868>.
- (135) Lin, Y. S.; Haynes, C. L. Impacts of Mesoporous Silica Nanoparticle Size, Pore Ordering, and Pore Integrity on Hemolytic Activity. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (13), 4834–4842. <https://doi.org/10.1021/ja910846q>.
- (136) Bimbo, L. M.; Mäkilä, E.; Laaksonen, T.; Lehto, V. P.; Salonen, J.; Hirvonen, J.; Santos, H. A. Drug Permeation across Intestinal Epithelial Cells Using Porous Silicon Nanoparticles. *Biomaterials* **2011**, *32* (10), 2625–2633.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.12.011>.
- (137) Rahman, I. A.; Padavettan, V. Synthesis of Silica Nanoparticles by Sol-Gel: Size-Dependent Properties, Surface Modification, and Applications in Silica-Polymer Nanocomposites a Review. *J. Nanomater.* **2012**, *2012*.
<https://doi.org/10.1155/2012/132424>.
- (138) Jal, P. K.; Patel, S.; Mishra, B. K. Chemical Modification of Silica Surface by Immobilization of Functional Groups for Extractive Concentration of Metal Ions. *Talanta* **2004**, *62* (5), 1005–1028. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2003.10.028>.
- (139) Livage, J. Sol-Gel Synthesis of Hybrid Materials. *Bull. Mater. Sci.* **1999**, *22* (3), 201–205.
<https://doi.org/10.1007/BF02749920>.
- (140) Pavan, C.; Delle Piane, M.; Gullo, M.; Filippi, F.; Fubini, B.; Hoet, P.; Horwell, C. J.; Huaux, F.; Lison, D.; Lo Giudice, C.; Martra, G.; Montfort, E.; Schins, R.; Sulpizi, M.; Wegner, K.; Wyart-Remy, M.; Ziemann, C.; Turci, F. The Puzzling Issue of Silica Toxicity: Are Silanols Bridging the Gaps between Surface States and Pathogenicity? *Part. Fibre Toxicol.* **2019**, *16* (1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12989-019-0315-3>.
- (141) Pavan, C.; Santalucia, R.; Leinardi, R.; Fabbiani, M.; Yakoub, Y.; Uwambayinema, F.; Ugliengo, P.; Tomatis, M.; Martra, G.; Turci, F.; Lison, D.; Fubini, B. Nearly Free Surface Silanols Are the Critical Molecular Moieties That Initiate the Toxicity of Silica Particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2020**, *117* (45), 27836–27846.
<https://doi.org/10.1073/pnas.2008006117>.
- (142) Bagheri, E.; Ansari, L.; Abnous, K.; Taghdisi, S. M.; Charbgo, F.; Ramezani, M.;

- Alibolandi, M. Silica Based Hybrid Materials for Drug Delivery and Bioimaging. *J. Control. Release* **2018**, 277 (January), 57–76. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.03.014>.
- (143) Gheonea, R.; Crasmareanu, E. C.; Plesu, N.; Sauca, S.; Simulescu, V.; Ilia, G. New Hybrid Materials Synthesized with Different Dyes by Sol-Gel Method. *Adv. Mater. Sci. Eng.* **2017**, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/4537039>.
- (144) Hong, R. Y.; Fu, H. P.; Zhang, Y. J.; Liu, L.; Wang, J.; Li, H. Z.; Zheng, Y. Surface-modified Silica Nanoparticles for Reinforcement of PMMA. *J. Appl. Polym. Sci.* **2007**, 105 (4), 2176–2184. <https://doi.org/10.1002/app.26164>.
- (145) Hoffmann, F.; Fröba, M. Vitalising Porous Inorganic Silica Networks with Organic Functions—PMOs and Related Hybrid Materials. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 40 (2), 608–620. <https://doi.org/10.1039/c0cs00076k>.
- (146) Khan, D.; Shaily. Synthesis and Catalytic Applications of Organo-Functionalized MCM-41 Catalyst: A Review. *Appl. Organomet. Chem.* **2023**, 37 (3), 1–38. <https://doi.org/10.1002/aoc.7007>.
- (147) Warad, I.; Omar, A. E. H.; Al-Resayes, S.; Husein, A.; Al-Nuri, M.; Boshala, A.; Al-Zaqri, N.; Hadda, T. Ben. Synthesis and Characterization of Hybrid Materials Consisting of N-Octadecyltriethoxysilane by Using n-Hexadecylamine as Surfactant and Q0 and T0 cross-Linkers. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, 13 (5), 6279–6291. <https://doi.org/10.3390/ijms13056279>.
- (148) Spange, S. Silica Surface Modification by Cationic Polymerization and Carbenium Intermediates. *Prog. Polym. Sci.* **2000**, 25 (6), 781–849. [https://doi.org/10.1016/S0079-6700\(00\)00014-9](https://doi.org/10.1016/S0079-6700(00)00014-9).
- (149) Antonucci, J. M.; Dickens, S. H.; Fowler, B. O.; Xu, H. H. K.; McDonough, W. G. Chemistry of Silanes: Interfaces in Dental Polymers and Composites. *J. Res. Natl. Inst. Stand. Technol.* **2005**, 110 (5), 541–558. <https://doi.org/10.6028/jres.110.081>.
- (150) Yen, G. C.; Duh, P. Der; Tsai, H. L. Antioxidant and Pro-Oxidant Properties of Ascorbic Acid and Gallic Acid. *Food Chem.* **2002**, 79 (3), 307–313. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00145-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00145-0).
- (151) Lu, Z.; Nie, G.; Belton, P. S.; Tang, H.; Zhao, B. Structure-Activity Relationship Analysis of Antioxidant Ability and Neuroprotective Effect of Gallic Acid Derivatives. *Neurochem. Int.* **2006**, 48 (4), 263–274. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2005.10.010>.
- (152) AL Zahrani, N. A.; El-Shishtawy, R. M.; Asiri, A. M. Recent Developments of Gallic Acid Derivatives and Their Hybrids in Medicinal Chemistry: A Review. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, 204, 112609. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112609>.
- (153) Peng, Z.; Li, Y.; Tan, L.; Chen, L.; Shi, Q.; Zeng, Q. H.; Liu, H.; Wang, J. J.; Zhao, Y. Anti-Tyrosinase, Antioxidant and Antibacterial Activities of Gallic Acid-Benzylidenehydrazine Hybrids and Their Application in Preservation of Fresh-Cut Apples and Shrimps. *Food Chem.* **2022**, 378 (May 2021), 132127. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132127>.

- (154) Hoyo, J.; Ivanova, K.; Guevas, E.; Tzanov, T. Multifunctional ZnO NPs-Chitosan-Gallic Acid Hybrid Nanocoating to Overcome Contact Lenses Associated Conditions and Discomfort. *J. Colloid Interface Sci.* **2019**, *543*, 114–121. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2019.02.043>.
- (155) Khan, S. A.; Shahid, S.; Mahmood, T.; Lee, C. S. Contact Lenses Coated with Hybrid Multifunctional Ternary Nanocoatings (Phytomolecule-Coated ZnO Nanoparticles:Gallic Acid:Tobramycin) for the Treatment of Bacterial and Fungal Keratitis. *Acta Biomater.* **2021**, *128*, 262–276. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.04.014>.
- (156) Ren, J.; Li, Q.; Dong, F.; Feng, Y.; Guo, Z. Phenolic Antioxidants-Functionalized Quaternized Chitosan: Synthesis and Antioxidant Properties. *Int. J. Biol. Macromol.* **2013**, *53*, 77–81. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.11.011>.
- (157) Xu, Z.; Liu, G.; Liu, P.; Hu, Y.; Chen, Y.; Fang, Y.; Sun, G.; Huang, H.; Wu, J. Hyaluronic Acid-Based Glucose-Responsive Antioxidant Hydrogel Platform for Enhanced Diabetic Wound Repair. *Acta Biomater.* **2022**, *147*, 147–157. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2022.05.047>.
- (158) Chen, W. Y. J. FUNCTIONS OF HYALURONAN IN WOUND REPAIR. In *Hyaluronan*; Elsevier, 2002; pp 147–156. <https://doi.org/10.1533/9781845693121.147>.
- (159) Pei, W.; Yusufu, Y.; Zhan, Y.; Wang, X.; Gan, J.; Zheng, L.; Wang, P.; Zhang, K.; Huang, C. Biosynthesizing Lignin Dehydrogenation Polymer to Fabricate Hybrid Hydrogel Composite with Hyaluronic Acid for Cartilage Repair. *Adv. Compos. Hybrid Mater.* **2023**, *6* (5), 180. <https://doi.org/10.1007/s42114-023-00758-6>.
- (160) Chandika, P.; Khan, F.; Heo, S.; Kim, T.; Kim, Y.-M.; Yi, M.; Jung, W.-K. Multifunctional Dual Cross-Linked Poly (Vinyl Alcohol)/Methacrylate Hyaluronic Acid/Chitooligosaccharide-Sinapic Acid Wound Dressing Hydrogel. *Int. J. Biol. Macromol.* **2022**, *222* (PA), 1137–1150. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.09.174>.
- (161) Jongprasitkul, H.; Parihar, V. S.; Turunen, S.; Kellomäki, M. PH-Responsive Gallol-Functionalized Hyaluronic Acid-Based Tissue Adhesive Hydrogels for Injection and Three-Dimensional Bioprinting. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2023**, *15* (28), 33972–33984. <https://doi.org/10.1021/acsami.3c02961>.
- (162) Carvalho, T.; Bártolo, R.; Pedro, S. N.; Valente, B. F. A.; Pinto, R. J. B.; Vilela, C.; Shahbazi, M.; Santos, H. A.; Freire, C. S. R. Injectable Nanocomposite Hydrogels of Gelatin-Hyaluronic Acid Reinforced with Hybrid Lysozyme Nanofibrils-Gold Nanoparticles for the Regeneration of Damaged Myocardium. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2023**, *15* (21), 25860–25872. <https://doi.org/10.1021/acsami.3c03874>.
- (163) Yu, Q.; Zhang, C.; Jiang, Z.; Qin, S.; Zhang, A. Mussel-Inspired Adhesive Polydopamine-Functionalized Hyaluronic Acid Hydrogel with Potential Bacterial Inhibition. *Glob. Challenges* **2020**, *4* (2), 1–7. <https://doi.org/10.1002/gch2.201900068>.
- (164) Ionescu, O. M.; Mignon, A.; Iacob, A. T.; Simionescu, N.; Confederat, L. G.; Tuchilus, C.; Profire, L. New Hyaluronic Acid/Polyethylene Oxide-Based Electrospun Nanofibers: Design, Characterization and In Vitro Biological Evaluation. *Polymers (Basel)*. **2021**, *13*

- (8), 1291. <https://doi.org/10.3390/polym13081291>.
- (165) Katiyar, S.; Tripathi, A. D.; Singh, R. K.; Chaurasia, A. K.; Srivastava, P. K.; Mishra, A. Graphene-Silymarin-Loaded Chitosan / Gelatin / Hyaluronic Acid Hybrid. *Int. J. Pharm.* **2024**, 124238. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2024.124238>.
- (166) Li, M.; Li, X.; Julian, D.; Shi, M.; Shang, Q.; Liu, X.; Liu, F. Physicochemical and Functional Properties of Lactoferrin-Hyaluronic Acid Complexes : Effect of Non-Covalent and Covalent Interactions. *LWT* **2021**, 151 (July), 112121. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112121>.
- (167) Zhang, S.; Hou, J.; Yuan, Q.; Xin, P.; Cheng, H.; Gu, Z. Arginine Derivatives Assist Dopamine-Hyaluronic Acid Hybrid Hydrogels to Have Enhanced Antioxidant Activity for Wound Healing. *Chem. Eng. J.* **2019**, No. August, 123775. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.123775>.
- (168) Chang, R.; Zhao, D.; Zhang, C.; Liu, K.; He, Y.; Guan, F.; Yao, M. Nanocomposite Multifunctional Hyaluronic Acid Hydrogel with Photothermal Antibacterial and Antioxidant Properties for Infected Wound Healing. *Int. J. Biol. Macromol.* **2023**, 226 (December 2022), 870–884. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.12.116>.
- (169) Braga, P. C.; Dal Sasso, M.; Lattuada, N.; Greco, V.; Sibilia, V.; Zucca, E.; Stucchi, L.; Ferro, E.; Ferrucci, F. Antioxidant Activity of Hyaluronic Acid Investigated by Means of Chemiluminescence of Equine Neutrophil Bursts and Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **2015**, 38 (1), 48–54. <https://doi.org/10.1111/jvp.12141>.
- (170) Merugu, R.; Gothwal, R.; Kaushik Deshpande, P.; De Mandal, S.; Padala, G.; Latha Chitturi, K. Synthesis of Ag/Cu and Cu/Zn Bimetallic Nanoparticles Using Toddy Palm: Investigations of Their Antitumor, Antioxidant and Antibacterial Activities. *Mater. Today Proc.* **2021**, 44, 99–105. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.08.027>.
- (171) Sharma, C.; Ansari, S.; Ansari, M. S.; Satsangee, S. P.; Srivastava, M. M. Single-Step Green Route Synthesis of Au/Ag Bimetallic Nanoparticles Using Clove Buds Extract: Enhancement in Antioxidant Bio-Efficacy and Catalytic Activity. *Mater. Sci. Eng. C* **2020**, 116 (June), 111153 (1-13). <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111153>.
- (172) Rastogi, S.; Kandasubramanian, B. Processing Trends of Silk Fibers: Silk Degumming, Regeneration and Physical Functionalization. *J. Text. Inst.* **2020**, 111 (12), 1794–1810. <https://doi.org/10.1080/00405000.2020.1727269>.
- (173) Li, G.; Liu, H.; Li, T.; Wang, J. Surface Modification and Functionalization of Silk Fibroin Fibers/Fabric toward High Performance Applications. *Mater. Sci. Eng. C* **2012**, 32 (4), 627–636. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2011.12.013>.
- (174) Das, G.; Seo, S.; Yang, I. J.; Patra, J. K.; Nguyen, L. T. H.; Shin, H. S. Synthesis of Biogenic Gold Nanoparticles by Using Sericin Protein from Bombyx Mori Silk Cocoon and Investigation of Its Wound Healing, Antioxidant, and Antibacterial Potentials. *Int. J. Nanomedicine* **2023**, 18, 17–34. <https://doi.org/10.2147/IJN.S378806>.
- (175) Shen, G.; Hu, X.; Guan, G.; Wang, L. Surface Modification and Characterisation of Silk

- Fibroin Fabric Produced by the Layer-by-Layer Self-Assembly of Multilayer Alginate/Regenerated Silk Fibroin. *PLoS One* **2015**, *10* (4), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124811>.
- (176) Liu, X.; Zhang, K.-Q. Silk Fiber — Molecular Formation Mechanism, Structure- Property Relationship and Advanced Applications. In *Oligomerization of Chemical and Biological Compounds*; InTech, 2014. <https://doi.org/10.5772/57611>.
- (177) Buga, M. R.; Zaharia, C.; Bălan, M.; Bressy, C.; Ziarelli, F.; Margaillan, A. Surface Modification of Silk Fibroin Fibers with Poly(Methyl Methacrylate) and Poly(Tributylsilyl Methacrylate) via RAFT Polymerization for Marine Antifouling Applications. *Mater. Sci. Eng. C* **2015**, *51*, 233–241. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.03.006>.
- (178) Lee, J. Y.; Lee, K. H. Synthesis of Silica Using Silk Sericin without Hydrolysis of Tetraethyl Orthosilicate. *Int. J. Indust. Entomol* **2013**, *27* (2), 298–302. <https://doi.org/10.7852/ijie.2013.27.2.298>.
- (179) Saravanan, A.; Huang, B. R.; Kathiravan, D.; Prasannan, A. Natural Biowaste-Cocoon-Derived Granular Activated Carbon-Coated ZnO Nanorods: A Simple Route to Synthesizing a Core-Shell Structure and Its Highly Enhanced UV and Hydrogen Sensing Properties. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9* (45), 39771–39780. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b11051>.
- (180) Barajas-Gamboa, J. A.; Serpa-Guerra, A. M.; Restrepo-Osorio, A.; Álvarez-López, C. Sericin Applications: A Globular Silk Protein. *Ing. y Compet.* **2016**, *18* (2), 193. <https://doi.org/10.25100/iyc.v18i2.2167>.
- (181) Eidet, J. R.; Reppe, S.; Pasovic, L.; Olstad, O. K.; Lyberg, T.; Khan, A. Z.; Fostad, I. G.; Chen, D. F.; Utheim, T. P. The Silk-Protein Sericin Induces Rapid Melanization of Cultured Primary Human Retinal Pigment Epithelial Cells by Activating the NF- κ B Pathway. *Sci. Rep.* **2016**, *6* (July 2015), 1–15. <https://doi.org/10.1038/srep22671>.
- (182) Pasovic, L.; Utheim, T. P.; Reppe, S.; Khan, A. Z.; Jackson, C. J.; Thiede, B.; Berg, J. P.; Messelt, E. B.; Eidet, J. R. Improvement of Storage Medium for Cultured Human Retinal Pigment Epithelial Cells Using Factorial Design. *Sci. Rep.* **2018**, *8* (1), 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24121-8>.
- (183) Kumar, J. P.; Mandal, B. B. Silk Sericin Induced Pro-Oxidative Stress Leads to Apoptosis in Human Cancer Cells. *Food Chem. Toxicol.* **2019**, *123* (October 2018), 275–287. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.10.063>.
- (184) Kanoujia, J.; Faizan, M.; Parashar, P.; Singh, N.; Saraf, S. A. Curcumin Loaded Sericin Nanoparticles: Assessment for Biomedical Application. *Food Hydrocoll. Heal.* **2021**, *1* (May), 100029. <https://doi.org/10.1016/j.fhfh.2021.100029>.
- (185) Miguel, G. A.; Álvarez-López, C. Extraction and Antioxidant Activity of Sericin, a Protein from Silk. *Brazilian J. Food Technol.* **2020**, *23*, 1–14. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.05819>.
- (186) Kumar, J. P.; Mandal, B. B. Antioxidant Potential of Mulberry and Non-Mulberry Silk

- Sericin and Its Implications in Biomedicine. *Free Radic. Biol. Med.* **2017**, *108* (May), 803–818. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.05.002>.
- (187) Cao, T.; Zhang, Y. Processing and Characterization of Silk Sericin from Bombyx Mori and Its Application in Biomaterials and Biomedicines. *Mater. Sci. Eng. C* **2016**, *61*, 940–952. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.12.082>.
- (188) Napavichayanun, S.; Lutz, O.; Fischnaller, M.; Jakschitz, T.; Bonn, G.; Aramwit, P. Identification and Quantification and Antioxidant Activity of Flavonoids in Different Strains of Silk Cocoon, Bombyx Mori. *Arch. Biochem. Biophys.* **2017**, *631*, 58–65. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2017.08.010>.
- (189) Zhao, J. G.; Zhang, Y. Q. A New Estimation of the Total Flavonoids in Silkworm Cocoon Sericin Layer through Aglycone Determination by Hydrolysis-Assisted Extraction and HPLC-DAD Analysis. *Food Nutr. Res.* **2016**, *60*. <https://doi.org/10.3402/fnr.v60.30932>.
- (190) Chlapanidas, T.; Faragò, S.; Lucconi, G.; Perteghella, S.; Galuzzi, M.; Mantelli, M.; Avanzini, M. A.; Tosca, M. C.; Marazzi, M.; Vigo, D.; Torre, M. L.; Faustini, M. Sericins Exhibit ROS-Scavenging, Anti-Tyrosinase, Anti-Elastase, and in Vitro Immunomodulatory Activities. *Int. J. Biol. Macromol.* **2013**, *58*, 47–56. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.03.054>.
- (191) TAKECHI, T.; WADA, R.; FUKUDA, T.; HARADA, K.; TAKAMURA, H. Antioxidant Activities of Two Sericin Proteins Extracted from Cocoon of Silkworm (Bombyx Mori) Measured by DPPH, Chemiluminescence, ORAC and ESR Methods. *Biomed. Reports* **2014**, *2* (3), 364–369. <https://doi.org/10.3892/br.2014.244>.
- (192) Lamboni, L.; Gauthier, M.; Yang, G.; Wang, Q. Silk Sericin: A Versatile Material for Tissue Engineering and Drug Delivery. *Biotechnol. Adv.* **2015**, *33* (8), 1855–1867. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.10.014>.
- (193) Kunz, R. I.; Brancalhão, R. M. C.; Ribeiro, L. D. F. C.; Natali, M. R. M. Silkworm Sericin: Properties and Biomedical Applications. *Biomed Res. Int.* **2016**, *2016*, 1–19. <https://doi.org/10.1155/2016/8175701>.
- (194) Silva, A. S.; Costa, E. C.; Reis, S.; Spencer, C.; Calhelha, R. C.; Miguel, S. P.; Ribeiro, M. P.; Barros, L.; Vaz, J. A.; Coutinho, P. Silk Sericin: A Promising Sustainable Biomaterial for Biomedical and Pharmaceutical Applications. *Polymers (Basel)*. **2022**, *14* (22), 1–22. <https://doi.org/10.3390/polym14224931>.
- (195) Meerasri, J.; Kongsin, K.; Chollakup, R.; Sothornvit, R. Characterization and Functional Properties of Novel Nanocomposite Sericin-Based Films Incorporated with Sericin Nanoparticles. *Chem. Eng. J. Adv.* **2023**, *16* (July), 100542. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2023.100542>.
- (196) Elahi, M.; Ali, S.; Tahir, H. M.; Mushtaq, R.; Bhatti, M. F. Sericin and Fibroin Nanoparticles—Natural Product for Cancer Therapy: A Comprehensive Review. *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.* **2021**, *70* (4), 256–269. <https://doi.org/10.1080/00914037.2019.1706515>.
- (197) Perteghella, S.; Rassu, G.; Gavini, E.; Obinu, A.; Bari, E.; Mandracchia, D.; Bonferoni,

- M. C.; Giunchedi, P.; Torre, M. L. Crocetin as New Cross-Linker for Bioactive Sericin Nanoparticles. *Pharmaceutics* **2021**, *13* (5), 680. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13050680>.
- (198) Shankar, S.; Murthy, A. N.; Rachitha, P.; Raghavendra, V. B.; Sunayana, N.; Chinnathambi, A.; Alharbi, S. A.; Basavegowda, N.; Brindhadevi, K.; Pugazhendhi, A. Silk Sericin Conjugated Magnesium Oxide Nanoparticles for Its Antioxidant, Anti-Aging, and Anti-Biofilm Activities. *Environ. Res.* **2023**, *223* (November 2022), 115421. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.115421>.
- (199) Orlandi, G.; Bari, E.; Catenacci, L.; Sorrenti, M.; Segale, L.; Faragò, S.; Sorlini, M.; Arciola, C. R.; Torre, M. L.; Perteghella, S. Polyphenols-Loaded Sericin Self-Assembling Nanoparticles: A Slow-Release for Regeneration by Tissue-Resident Mesenchymal Stem/Stromal Cells. *Pharmaceutics* **2020**, *12* (4), 381. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12040381>.
- (200) Mumtaz, S.; Ali, S.; Kazmi, S. A. R.; Mughal, T. A.; Mumtaz, S.; Tahir, H. M.; Summer, M.; Ara, C.; Rashid, M. I. Analysis of the Antimicrobial Potential of Sericin-Coated Silver Nanoparticles against Human Pathogens. *Microsc. Res. Tech.* **2023**, *86* (3), 320–330. <https://doi.org/10.1002/jemt.24273>.
- (201) Ho, M.; Wang, H.; Lau, K. Thermal Properties and Structure Conformation on Silkworm Silk Fibre. *Compos. Aust. CRC-ACS* **2012**, No. Figure 1, 15–16.
- (202) Georgiou, Y.; Rapti, S.; Mavrogiorgou, A.; Armatas, G.; Manos, M. J.; Louloudi, M.; Deligiannakis, Y. A Hybrid {Silk@Zirconium MOF} Material as Highly Efficient AsIII-Sponge. *Sci. Rep.* **2020**, *10* (1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66091-w>.
- (203) Maji, T. K.; Basu, D.; Datta, C.; Banerjee, A. Studies of Mechanical and Moisture Regain Properties of Methyl Methacrylate Grafted Silk Fibers. *J. Appl. Polym. Sci.* **2002**, *84* (5), 969–974. <https://doi.org/10.1002/app.10202>.
- (204) Shang, S.; Zhu, L.; Chen, W.; Yi, L.; Qi, D.; Yang, L. Reducing Silk Fibrillation through MMA Graft Method. *Fibers Polym.* **2009**, *10* (6), 807–812. <https://doi.org/10.1007/s12221-009-0807-0>.
- (205) Prachayawarakorn, J.; Boonsawat, K. Physical, Chemical, and Dyeing Properties OfBombyx Mori Silks Grafted by 2-Hydroxyethyl Methacrylate and Methyl Methacrylate. *J. Appl. Polym. Sci.* **2007**, *106* (3), 1526–1534. <https://doi.org/10.1002/app.26586>.
- (206) Kostov, G.; Nikolov, A.; Atanassov, A. Grafting of Methyl Methacrylate (MMA) onto Antheraea Assama Silk Fiber. *J. Appl. Polym. Sci.* **2001**, *81* (11), 2633–2641. <https://doi.org/10.1002/app.1707>.
- (207) Peng, Q.; Xu, Q.; Sun, D.; Shao, Z. Grafting of Methyl Methacrylate onto Antheraea Pernyi Silk Fiber with the Assistance of Supercritical CO₂. *J. Appl. Polym. Sci.* **2006**, *100* (2), 1299–1305. <https://doi.org/10.1002/app.23408>.
- (208) Ojah, R.; Dolui, S. K. Graft Copolymerization of Vinyl Monomers onto Silk Fibers Initiated by a Semiconductor-based Photocatalyst. *J. Appl. Polym. Sci.* **2007**, *105* (4), 2164–2175. <https://doi.org/10.1002/app.25986>.

- (209) Kameda, T.; Tsukada, M. Structure and Thermal Analyses of MAA-Grafted Silk Fiber Using DSC and ^{13}C Solid-State NMR. *Macromol. Mater. Eng.* **2006**, *291* (7), 877–882. <https://doi.org/10.1002/mame.200600081>.
- (210) Furuzono, T.; Ishihara, K.; Nakabayashi, N.; Tamada, Y. Chemical Modification of Silk Fibroin with 2-Methacryloyloxyethyl Phosphorylcholine. II. Graft-Polymerization onto Fabric through 2-Methacryloyloxyethyl Isocyanate and Interaction between Fabric and Platelets. *Biomaterials* **2000**, *21* (4), 327–333. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(99\)00177-5](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(99)00177-5).
- (211) Das, A. M.; Chowdhury, P. K.; Saikia, C. N.; Rao, P. G. Some Physical Properties and Structure Determination of Vinyl Monomer-Grafted Antheraea Assama Silk Fiber. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2009**, *48* (20), 9338–9345. <https://doi.org/10.1021/ie9004755>.
- (212) Chen, G.; Guan, J.; Xing, T.; Zhou, X. Properties of Silk Fibers Modified with Diethylene Glycol Dimethacrylate. *J. Appl. Polym. Sci.* **2006**, *102* (1), 424–428. <https://doi.org/10.1002/app.24064>.
- (213) Guan, J.; Chen, G. Flame Resistant Modification of Silk Fabric with Vinyl Phosphate. *Fibers Polym.* **2008**, *9* (4), 438–443. <https://doi.org/10.1007/s12221-008-0070-9>.
- (214) Tsukada, M.; Arai, T.; Winkler, S.; Freddi, G.; Ishikawa, H. Physical Properties of Silk Fibers Grafted with Vinyltrimethoxysilane. *J. Appl. Polym. Sci.* **2001**, *79* (10), 1764–1770. [https://doi.org/10.1002/1097-4628\(20010307\)79:10<1764::AID-APP40>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/1097-4628(20010307)79:10<1764::AID-APP40>3.0.CO;2-E).
- (215) Wang, X.; Kaplan, D. L. Functionalization of Silk Fibroin with NeutrAvidin and Biotin. *Macromol. Biosci.* **2011**, *11* (1), 100–110. <https://doi.org/10.1002/mabi.201000173>.
- (216) Jin, H. J.; Park, J.; Valluzzi, R.; Cebe, P.; Kaplan, D. L. Biomaterial Films of Bombyx Mori Silk Fibroin with Poly(Ethylene Oxide). *Biomacromolecules* **2004**, *5* (3), 711–717. <https://doi.org/10.1021/bm0343287>.
- (217) Hausken, K. G.; Frevol, R. L.; Dowdle, K. P.; Young, A. N.; Talusig, J. M.; Holbrook, C. C.; Rubin, B. K.; Murphy, A. R. Quantitative Functionalization of the Tyrosine Residues in Silk Fibroin through an Amino-Tyrosine Intermediate. *Macromol. Chem. Phys.* **2022**, *223* (17), 1–11. <https://doi.org/10.1002/macp.202200119>.
- (218) Wöltje, M.; Brünler, R.; Böbel, M.; Ernst, S.; Neuss, S.; Aibibu, D.; Cherif, C. Functionalization of Silk Fibers by PDGF and Bioceramics for Bone Tissue Regeneration. *Coatings* **2020**, *10* (1), 1–18. <https://doi.org/10.3390/coatings10010008>.
- (219) Liu, C.; Bai, H.; He, B.; He, X.; Zhang, J.; Chen, C.; Qiu, Y.; Hu, R.; Zhao, F.; Zhang, Y.; He, W.; Chau, J. H. C.; Chen, S.; Lam, J. W. Y.; Tang, B. Z. Functionalization of Silk by AIEgens through Facile Bioconjugation: Full-Color Fluorescence and Long-Term Bioimaging. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2021**, *60* (22), 12424–12430. <https://doi.org/10.1002/anie.202015592>.
- (220) Davarpanah, S.; Mahmoodi, N. M.; Arami, M.; Bahrami, H.; Mazaheri, F. Environmentally Friendly Surface Modification of Silk Fiber: Chitosan Grafting and Dyeing. *Appl. Surf. Sci.* **2009**, *255* (7), 4171–4176.

<https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2008.11.001>.

- (221) Cao, J.; Wang, C. Multifunctional Surface Modification of Silk Fabric via Graphene Oxide Repeatedly Coating and Chemical Reduction Method. *Appl. Surf. Sci.* **2017**, *405*, 380–388. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2017.02.017>.
- (222) Gao, L. Z.; Bao, Y.; Cai, H. H.; Zhang, A. P.; Ma, Y.; Tong, X. L.; Li, Z.; Dai, F. Y. Multifunctional Silk Fabric via Surface Modification of Nano-SiO₂. *Text. Res. J.* **2020**, *90* (13–14), 1616–1627. <https://doi.org/10.1177/0040517519897112>.
- (223) Zainudin, Z.; Mohd Yusoff, N. I. S.; Wahit, M. U.; Che Man, S. H. Mechanical, Thermal, Void Fraction and Water Absorption of Silane Surface Modified Silk Fiber Reinforced Epoxy Composites. *Polym. Technol. Mater.* **2020**, *59* (18), 1987–2002. <https://doi.org/10.1080/25740881.2020.1784215>.
- (224) Pang, H.; Zhao, S.; Mo, L.; Wang, Z.; Zhang, W.; Huang, A.; Zhang, S.; Li, J. Mussel-Inspired Bio-Based Water-Resistant Soy Adhesives with Low-Cost Dopamine Analogue-Modified Silkworm Silk Fiber. *J. Appl. Polym. Sci.* **2020**, *137* (23), 1–10. <https://doi.org/10.1002/app.48785>.
- (225) Song, Y.; Li, L.; Zhao, W.; Qian, Y.; Dong, L.; Fang, Y.; Yang, L.; Fan, Y. Surface Modification of Electrospun Fibers with Mechano-Growth Factor for Mitigating the Foreign-Body Reaction. *Bioact. Mater.* **2021**, *6* (9), 2983–2998. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.02.020>.
- (226) Peng, C.; Shu, Z.; Zhang, C.; Chen, X.; Wang, M.; Fan, L. Surface Modification of Silk Fibroin Composite Bone Scaffold with Polydopamine Coating to Enhance Mineralization Ability and Biological Activity for Bone Tissue Engineering. *J. Appl. Polym. Sci.* **2022**, *139* (38). <https://doi.org/10.1002/app.52900>.
- (227) Elahi, M. F.; Guan, G.; Wang, L.; Zhao, X.; Wang, F.; King, M. W. Surface Modification of Silk Fibroin Fabric Using Layer-by-Layer Polyelectrolyte Deposition and Heparin Immobilization for Small-Diameter Vascular Prostheses. *Langmuir* **2015**, *31* (8), 2517–2526. <https://doi.org/10.1021/la504503w>.
- (228) Li, G.; Liu, H.; Zhao, H.; Gao, Y.; Wang, J.; Jiang, H.; Boughton, R. I. Chemical Assembly of TiO₂ and TiO₂@Ag Nanoparticles on Silk Fiber to Produce Multifunctional Fabrics. *J. Colloid Interface Sci.* **2011**, *358* (1), 307–315. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.02.053>.
- (229) Aslanidou, D.; Karapanagiotis, I.; Panayiotou, C. Superhydrophobic, Superoleophobic Coatings for the Protection of Silk Textiles. *Prog. Org. Coatings* **2016**, *97*, 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2016.03.013>.
- (230) Baek, N. won; Fan, X. rong; Yuan, J. gang; Xu, J.; Wang, Q. Polymerization and Dyeing Properties of Gallic Acid on Silk Fabric Catalyzed by Horseradish Peroxidase. *Fibers Polym.* **2021**, *22* (8), 2145–2155. <https://doi.org/10.1007/s12221-021-0673-y>.
- (231) Movasaghi, Z.; Rehman, S.; Rehman, I. U. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues. *Appl. Spectrosc. Rev.* **2008**, *43* (2), 134–179. <https://doi.org/10.1080/05704920701829043>.

- (232) Schmitt, J.; Flemming, H. C. FTIR-Spectroscopy in Microbial and Material Analysis. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **1998**, *41* (1), 1–11. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(98\)80002-4](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(98)80002-4).
- (233) Cialla-May, D.; Schmitt, M.; Popp, J. Theoretical Principles of Raman Spectroscopy. *Phys. Sci. Rev.* **2019**, *4* (6), 1–9. <https://doi.org/10.1515/psr-2017-0040>.
- (234) Krafft, C.; Schie, I. W.; Meyer, T.; Schmitt, M.; Popp, J. Developments in Spontaneous and Coherent Raman Scattering Microscopic Imaging for Biomedical Applications. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45* (7), 1819–1849. <https://doi.org/10.1039/c5cs00564g>.
- (235) Francioso, O.; Montecchio, D.; Gioacchini, P.; Ciavatta, C. Thermal Analysis (TG-DTA) and Isotopic Characterization (^{13}C - ^{15}N) of Humic Acids from Different Origins. *Appl. Geochemistry* **2005**, *20* (3), 537–544. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2004.10.003>.
- (236) Hunger, M.; Weitkamp, J. In Situ IR, NMR, EPR, and UV/Vis Spectroscopy: Tools for New Insight into the Mechanisms of Heterogeneous Catalysis. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2001**, *40* (16), 2954–2971. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20010817\)40:16<2954::aid-anie2954>3.0.co;2-%23](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20010817)40:16<2954::aid-anie2954>3.0.co;2-%23).
- (237) Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT - Food Sci. Technol.* **1995**, *28* (1), 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5).
- (238) Mishra, K.; Ojha, H.; Chaudhury, N. K. Estimation of Antiradical Properties of Antioxidants Using DPPH- Assay: A Critical Review and Results. *Food Chem.* **2012**, *130* (4), 1036–1043. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.127>.
- (239) Duin, E. Electron Paramagnetic Resonance Theory. *Assess. Funct. Struct. Mol. Transp. by EPR Spectrosc.* **2012**, 7–52.
- (240) Goldfarb, D., Stoll, S. *EPR Spectroscopy: Fundamentals and Methods*; Blackwell: Hoboken, Ed.; Wiley, 2018.
- (241) Weil, J. A.; Bolton, J. R.; Wertz, J. E. *Electron Spin Resonance Elementary Theory and Practical Applications*; 1994.
- (242) O’Handley, R. C. *Modern Magnetic Materials: Principles and Applications*; Wiley: New York, 2000.
- (243) Barroso-Martínez, J. S.; Romo, A. I. B.; Pudar, S.; Putnam, S. T.; Bustos, E.; Rodríguez-López, J. Real-Time Detection of Hydroxyl Radical Generated at Operating Electrodes via Redox-Active Adduct Formation Using Scanning Electrochemical Microscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **2022**, *144* (41), 18896–18907. <https://doi.org/10.1021/jacs.2c06278>.
- (244) Shaeib, F.; Banerjee, J.; Maitra, D.; Diamond, M. P.; Abu-Soud, H. M. Impact of Hydrogen Peroxide-Driven Fenton Reaction on Mouse Oocyte Quality. *Free Radic. Biol. Med.* **2013**, *58*, 154–159. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.12.007>.
- (245) Burgos Castillo Rutely, C.; Fontmorin, J. M.; Tang Walter, Z.; Xochitl, D. B.; Mika, S. Towards Reliable Quantification of Hydroxyl Radicals in the Fenton Reaction Using Chemical Probes. *RSC Adv.* **2018**, *8* (10), 5321–5330. <https://doi.org/10.1039/c7ra13209c>.

- (246) Deng, T.; Hu, S.; Huang, X. an; Song, J.; Xu, Q.; Wang, Y.; Liu, F. A Novel Strategy for Colorimetric Detection of Hydroxyl Radicals Based on a Modified Griess Test. *Talanta* **2019**, *195* (November 2018), 152–157. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.11.044>.
- (247) Pryor, W. A. Oxy-Radicals and Related Species: Their Formation, Lifetimes, and Reactions. *Annu. Rev. Physiol.* **1986**, *48* (1), 657–667. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.48.030186.003301>.
- (248) Kukisawa, T.; Kuwabara, Y.; Nosaka, A. Y.; Nosaka, Y. Applications of Some EPR Methods to the Investigation of the Radical Species Produced by the Reactions of Hydroxyl Radicals with PEFC-Related Fluorinated Organic Acids. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2022**, *24* (38), 23472–23480. <https://doi.org/10.1039/d2cp02370a>.
- (249) Bartoszek, M.; Polak, J. An Electron Paramagnetic Resonance Study of Antioxidant Properties of Alcoholic Beverages. *Food Chem.* **2012**, *132* (4), 2089–2093. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.12.060>.
- (250) Giordano, A.; Morales-Tapia, P.; Moncada-Basualto, M.; Pozo-Martínez, J.; Olea-Azar, C.; Nesic, A.; Cabrera-Barjas, G. Polyphenolic Composition and Antioxidant Activity (ORAC, EPR and Cellular) of Different Extracts of *Argylia Radiata* Vitroplants and Natural Roots. *Molecules* **2022**, *27* (3), 610. <https://doi.org/10.3390/molecules27030610>.
- (251) Marchi, R. C.; Campos, I. A. S.; Santana, V. T.; Carlos, R. M. Chemical Implications and Considerations on Techniques Used to Assess the in Vitro Antioxidant Activity of Coordination Compounds. *Coord. Chem. Rev.* **2022**, *451*, 214275. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2021.214275>.
- (252) Davies, M. J. Detection and Characterisation of Radicals Using Electron Paramagnetic Resonance (EPR) Spin Trapping and Related Methods. *Methods* **2016**, *109* (2016), 21–30. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2016.05.013>.
- (253) Sanna, D.; Fadda, A. Role of the Hydroxyl Radical-Generating System in the Estimation of the Antioxidant Activity of Plant Extracts by Electron Paramagnetic Resonance (EPR). *Molecules* **2022**, *27* (14). <https://doi.org/10.3390/molecules27144560>.
- (254) Pei, S.; You, S.; Ma, J.; Chen, X.; Ren, N. Electron Spin Resonance Evidence for Electro-Generated Hydroxyl Radicals. *Environ. Sci. Technol.* **2020**, *54* (20), 13333–13343. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c05287>.
- (255) Cook, M. A. Theory of Adsorption of Grases on Solids. *J. Am. Chem. Soc.* **1948**, *70* (9), 2925–2930. <https://doi.org/10.1021/ja01189a029>.
- (256) Khalfaoui, M.; Knani, S.; Hachicha, M. A.; Lamine, A. B. New Theoretical Expressions for the Five Adsorption Type Isotherms Classified by BET Based on Statistical Physics Treatment. *J. Colloid Interface Sci.* **2003**, *263* (2), 350–356. [https://doi.org/10.1016/S0021-9797\(03\)00139-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9797(03)00139-5).
- (257) Ambroz, F.; Macdonald, T. J.; Martis, V.; Parkin, I. P. Evaluation of the BET Theory for the Characterization of Meso and Microporous MOFs. *Small Methods* **2018**, *2* (11), 1–17. <https://doi.org/10.1002/smt.201800173>.

- (258) Barrett, E. P.; Joyner, L. G.; Halenda, P. P. The Determination of Pore Volume and Area Distributions in Porous Substances. I. Computations from Nitrogen Isotherms. *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, *73* (1), 373–380. <https://doi.org/10.1021/ja01145a126>.
- (259) Masthan, S. K.; Rao, K. S. R.; Prasad, P. S. S.; Rao, P. K. Derivation of the Expanded Form of the BJH Equation and Its Application to the Pore Structure Analysis of Mesoporous Adsorbents. *Adsorpt. Sci. Technol.* **1992**, *9* (4), 212–230. <https://doi.org/10.1177/026361749200900401>.
- (260) Kalaitzaki, A.; Papanikolaou, N. E.; Karamaouna, F.; Dourtoglou, V.; Xenakis, A.; Papadimitriou, V. Biocompatible Colloidal Dispersions as Potential Formulations of Natural Pyrethrins: A Structural and Efficacy Study. *Langmuir* **2015**, *31* (21), 5722–5730. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b00246>.
- (261) Satoh, A.; Chantrell, R. W.; Coverdale, G. N. Brownian Dynamics Simulations of Ferromagnetic Colloidal Dispersions in a Simple Shear Flow. *J. Colloid Interface Sci.* **1999**, *209* (1), 44–59. <https://doi.org/10.1006/jcis.1998.5826>.
- (262) Dalstein, L.; Ben Haddada, M.; Barbillon, G.; Humbert, C.; Tadjeddine, A.; Boujday, S.; Busson, B. Revealing the Interplay between Adsorbed Molecular Layers and Gold Nanoparticles by Linear and Nonlinear Optical Properties. *J. Phys. Chem. C* **2015**, *119* (30), 17146–17155. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b03601>.
- (263) Corbett, J. C.; McNeil-Watson, F. Electrophoretic Light Scattering. In *Encyclopedia of Biophysics*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2018; Vol. 4, pp 1–10. https://doi.org/10.1007/978-3-642-35943-9_288-1.
- (264) She, C. Y.; Dinh, N. D.; Tu, A. T. Laser Raman Scattering of Glucosamine N-Acetylglucosamine, and Glucuronic Acid. *BBA - Gen. Subj.* **1974**, *372* (2), 345–357. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(74\)90196-2](https://doi.org/10.1016/0304-4165(74)90196-2).
- (265) Theofanous, A.; Deligiannakis, Y.; Louloudi, M. A {Silk@Gallic-Acid} Hybrid Material with Controllable Antioxidant Hydrogen-Atom-Transfer Activity. *Appl. Res.* **2024**, No. March, 1–16. <https://doi.org/10.1002/appl.202400043>.
- (266) Kovács, A.; Nyerges, B.; Izvekov, V. Vibrational Analysis of N -Acetyl- α - d - Glucosamine and β - d -Glucuronic Acid. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112* (18), 5728–5735. <https://doi.org/10.1021/jp710432d>.
- (267) GEORGE SOCRATES. Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies: Tables and Charts. *John Wiley Sons Ltd*, **2001**, *3rd editio*.
- (268) Cai, Q.; Xue, J.; Wang, Q.; Du, Y. Investigation into Structure and Dehydration Dynamic of Gallic Acid Monohydrate: A Raman Spectroscopic Study. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2018**, *201*, 128–133. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2018.05.002>.
- (269) Goldstein, M. Infrared Characteristic Group Frequencies. *Endeavour* **1981**, *5* (2), 90–91. <https://doi.org/978-0-470-09307-8>.
- (270) Panagiota, S.; Louloudi, M.; Deligiannakis, Y. EPR Study of Phenolic Radical Stabilization by Grafting on SiO₂. *Chem. Phys. Lett.* **2009**, *472* (1–3), 85–89.

<https://doi.org/10.1016/j.cplett.2009.02.080>.

- (271) Mayerhöfer, T. G.; Pahlow, S.; Popp, J. The Bouguer-Beer-Lambert Law: Shining Light on the Obscure. *Chemphyschem* **2020**, *21* (18), 2029–2046. <https://doi.org/10.1002/cphc.202000464>.
- (272) Gournis, D.; Deligiannakis, Y.; Karakassides, M. A.; Boussac, A.; Ioannidis, N.; Petridis, D. Stability Study of Tyrosinate Radical in a Restricted Phyllomorphous Medium. *Langmuir* **2002**, *18* (25), 10024–10029. <https://doi.org/10.1021/la026292u>.
- (273) Foti, M. C.; Daquino, C.; Mackie, I. D.; DiLabio, G. A.; Ingold, K. U. Reaction of Phenols with the 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl Radical. Kinetics and DFT Calculations Applied to Determine ArO-H Bond Dissociation Enthalpies and Reaction Mechanism. *J. Org. Chem.* **2008**, *73* (23), 9270–9282. <https://doi.org/10.1021/jo8016555>.
- (274) Foti, M. C. Solvent Effects on the Activation Parameters of the Reaction between an A-tocopherol Analogue and Dpph •: The Role of H-bonded Complexes. *Int. J. Chem. Kinet.* **2012**, *44* (8), 524–531. <https://doi.org/10.1002/kin.20619>.
- (275) Agarwal, R. G.; Coste, S. C.; Groff, B. D.; Heuer, A. M.; Noh, H.; Parada, G. A.; Wise, C. F.; Nichols, E. M.; Warren, J. J.; Mayer, J. M. Free Energies of Proton-Coupled Electron Transfer Reagents and Their Applications. *Chem. Rev.* **2022**, *122* (1), 1–49. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00521>.
- (276) Fragou, F.; Zindrou, A.; Deligiannakis, Y.; Louloudi, M. Carbon-SiO₂ Hybrid Nanoparticles with Enhanced Radical Stabilization and Biocide Activity. *ACS Appl. Nano Mater.* **2023**, *6* (22), 20841–20854. <https://doi.org/10.1021/acsanm.3c03852>.
- (277) Psathas, P.; Moularas, C.; Smykała, S.; Deligiannakis, Y. Highly Crystalline Nanosized NaTaO₃/NiO Heterojunctions Engineered by Double-Nozzle Flame Spray Pyrolysis for Solar-to-H₂ Conversion: Toward Industrial-Scale Synthesis. *ACS Appl. Nano Mater.* **2023**, *6* (4), 2658–2671. <https://doi.org/10.1021/acsanm.2c05066>.
- (278) Lloyd, R. V.; Hanna, P. M.; Mason, R. P. The Origin of the Hydroxyl Radical Oxygenin the Fenton Reaction. *Free Radic. Biol. Med.* **1997**, *22* (5), 885–888. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(96\)00432-7](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(96)00432-7).
- (279) Kanigaridou, Y.; Petala, A.; Frontistis, Z.; Antonopoulou, M.; Solakidou, M.; Konstantinou, I.; Deligiannakis, Y.; Mantzavinos, D.; Kondarides, D. I. Solar Photocatalytic Degradation of Bisphenol A with CuOx/BiVO₄: Insights into the Unexpectedly Favorable Effect of Bicarbonates. *Chem. Eng. J.* **2017**, *318*, 39–49. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.04.145>.
- (280) Wang, L.; Fu, Y.; Li, Q.; Wang, Z. EPR Evidence for Mechanistic Diversity of Cu(II)/Peroxygen Oxidation Systems by Tracing the Origin of DMPO Spin Adducts. *Environ. Sci. Technol.* **2022**, *56* (12), 8796–8806. <https://doi.org/10.1021/acs.est.2c00459>.
- (281) Takayanagi, T.; Kimiya, H.; Ohyama, T. Formation of Artifactual DMPO-OH Spin Adduct in Acid Solutions Containing Nitrite Ions. *Free Radic. Res.* **2017**, *51* (7–8), 739–748. <https://doi.org/10.1080/10715762.2017.1369536>.

- (282) Bauer, N. A.; Hoque, E.; Wolf, M.; Kleigrew, K.; Hofmann, T. Detection of the Formyl Radical by EPR Spin-Trapping and Mass Spectrometry. *Free Radic. Biol. Med.* **2018**, *116* (December 2017), 129–133. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.01.002>.
- (283) Fagan, W. P.; Villamena, F. A.; Zweier, J. L.; Weavers, L. K. In Situ EPR Spin Trapping and Competition Kinetics Demonstrate Temperature-Dependent Mechanisms of Synergistic Radical Production by Ultrasonically Activated Persulfate. *Environ. Sci. Technol.* **2022**, *56* (6), 3729–3738. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c08562>.
- (284) Walger, E.; Marlin, N.; Mortha, G.; Molton, F.; Duboc, C. Hydroxyl Radical Generation by the H₂O₂/CuII/Phenanthroline System under Both Neutral and Alkaline Conditions: An Epr/Spin-trapping Investigation. *Appl. Sci.* **2021**, *11* (2), 1–15. <https://doi.org/10.3390/app11020687>.
- (285) Ueno, M.; Nakanishi, I.; Matsumoto, K. ichiro. Inhomogeneous Generation of Hydroxyl Radicals in Hydrogen Peroxide Solution Induced by Ultraviolet Irradiation and in a Fenton Reaction System. *Free Radic. Res.* **2021**, *55* (4), 481–489. <https://doi.org/10.1080/10715762.2020.1819995>.
- (286) Hernandez-Marin, E.; Martínez, A. Carbohydrates and Their Free Radical Scavenging Capability: A Theoretical Study. *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116* (32), 9668–9675. <https://doi.org/10.1021/jp304814r>.
- (287) Morelli, R.; Russo-Volpe, S.; Bruno, N.; Lo Scalzo, R. Fenton-Dependent Damage to Carbohydrates: Free Radical Scavenging Activity of Some Simple Sugars. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51* (25), 7418–7425. <https://doi.org/10.1021/jf030172q>.
- (288) Marino, T.; Galano, A.; Russo, N. Radical Scavenging Ability of Gallic Acid toward OH and OOH Radicals. Reaction Mechanism and Rate Constants from the Density Functional Theory. *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118* (35), 10380–10389. <https://doi.org/10.1021/jp505589b>.
- (289) Pant, A. F.; Özkasikci, D.; Fürtauer, S.; Reinelt, M. The Effect of Deprotonation on the Reaction Kinetics of an Oxygen Scavenger Based on Gallic Acid. **2019**, *7* (November), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00680>.
- (290) Llano, S.; Gómez, S.; Londoño, J.; Restrepo, A. Antioxidant Activity of Curcuminoids. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2019**, *21* (7), 3752–3760. <https://doi.org/10.1039/C8CP06708B>.
- (291) Parcheta, M.; Swisłocka, R. Recent Developments in Effective Antioxidants : The Structure and Antioxidant Properties. *Materials (Basel)*. **2021**, *14*, 1–24. <https://doi.org/10.3390/ma14081984>.
- (292) Samanta, S.; Rangasami, V. K.; Murugan, N. A.; Parihar, V. S.; Varghese, O. P.; Oommen, O. P. Polymer Chemistry on the Chemical Reactivity and Bioactivity Of. **2021**, 2987–2991. <https://doi.org/10.1039/d1py00013f>.
- (293) Takayanagi, T.; Kimiya, H.; Ohyama, T. Formation of Artifactual DMPO-OH Spin Adduct in Acid Solutions Containing Nitrite Ions. *Free Radic. Res.* **2017**, *51* (7–8), 739–748. <https://doi.org/10.1080/10715762.2017.1369536>.

- (294) Bauer, N. A.; Hoque, E.; Wolf, M.; Kleigrew, K.; Hofmann, T. Detection of the Formyl Radical by EPR Spin-Trapping and Mass Spectrometry. *Free Radic. Biol. Med.* **2018**, *116* (August 2017), 129–133. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.01.002>.
- (295) Fagan, W. P.; Villamena, F. A.; Zweier, J. L.; Weavers, L. K. In Situ EPR Spin Trapping and Competition Kinetics Demonstrate Temperature-Dependent Mechanisms of Synergistic Radical Production by Ultrasonically Activated Persulfate. *Environ. Sci. Technol.* **2022**, *56* (6), 3729–3738. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c08562>.
- (296) Theofanous, A.; Deligiannakis, Y.; Louloudi, M. Hybrids of Gallic Acid @ SiO₂ and { Hyaluronic-Acid Counterparts } @ SiO₂ against Hydroxyl (• OH) Radicals Studied by EPR : A Comparative Study vs Their Antioxidant Hydrogen Atom Transfer Activity. **2024**. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.4c02760>.
- (297) Bates, J. B. Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Science* (80-.). **1976**, *191* (4222), 31–37. <https://doi.org/10.1126/science.1246596>.
- (298) Capeletti, L. B.; Baibich, I. M.; Butler, I. S.; Dos Santos, J. H. Z. Infrared and Raman Spectroscopic Characterization of Some Organic Substituted Hybrid Silicas. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2014**, *133*, 619–625. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2014.05.072>.
- (299) Belhaj Khalifa, I.; Ladhari, N.; Nemeshwaree, B.; Campagne, C. Crosslinking of Sericin on Air Atmospheric Plasma Treated Polyester Fabric. *J. Text. Inst.* **2017**, *108* (5), 840–845. <https://doi.org/10.1080/00405000.2016.1193983>.
- (300) Sano, S.; Kato, K.; Ikada, Y. Introduction of Functional Groups onto the Surface of Polyethylene for Protein Immobilization. *Biomaterials* **1993**, *14* (11), 817–822. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(93\)90003-K](https://doi.org/10.1016/0142-9612(93)90003-K).
- (301) Xu, P.; Wang, H.; Tong, R.; Du, Q.; Zhong, W. Preparation and Morphology of SiO₂/PMMA Nanohybrids by Microemulsion Polymerization. *Colloid Polym. Sci.* **2006**, *284* (7), 755–762. <https://doi.org/10.1007/s00396-005-1428-9>.
- (302) Fidalgo, A.; Rosa, M. E.; Ilharco, L. M. Chemical Control of Highly Porous Silica Xerogels: Physical Properties and Morphology. *Chem. Mater.* **2003**, *15* (11), 2186–2192. <https://doi.org/10.1021/cm031013p>.